

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

**ROBERTA RODRIGUES DO ESPÍRITO SANTO**

**DISFUNÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO, NEUROINFLAMAÇÃO E  
DANO COGNITIVO APÓS MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE  
PNEUMOCÓCICA**

**CRICIÚMA, MAIO DE 2025**

**ROBERTA RODRIGUES DO ESPÍRITO SANTO**

**DISFUNÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO, NEUROINFLAMAÇÃO E  
DANO COGNITIVO APÓS MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE  
PNEUMOCÓCICA**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Barichello  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jaqueline da Silva  
Generoso

**CRICIÚMA, MAIO DE 2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237d Santo, Roberta Rodrigues Do Espírito.  
Disfunção do sistema glinfático,  
neuroinflamação e dano cognitivo após modelo  
experimental de meningite pneumocócica/ Roberta  
Rodrigues Do Espírito Santo. - 2025.  
65 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Tatiana Barichello.

Coorientação: Jaqueline da Silva Generoso.

1. Sistema glinfático. 2. Meningite  
pneumocócica. 3. Dano cognitivo. 4. Inflamação.  
I. Título.

CDD 23. ed. 616.82

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

## PARECER

No dia 20 (vinte) do mês de março de 2025, às 14 (quatorze) horas, na Sala 108/Bloco R1, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “DISFUNÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO, NEUROINFLAMAÇÃO E DANO COGNITIVO APÓS MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA”, da candidata Roberta Rodrigues do Espírito Santo. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Membro Relator – UNESC), Dra. Josiane Budni (Membro Interno – UNESC), Dra. Fernanda de Oliveira Meller (Membro Externo – UNESC) e Dra. Tatiani Bellettini (Membro Externo – UNESC/ES). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

Trabalho não aprovado

Observações:

---

---

---

Criciúma, SC, 20 de março de 2025.

Documento assinado digitalmente  
 FABRICIA CARDOSO PETRONILHO  
Data: 16/04/2025 16:56:37-0300  
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

**Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO**  
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 JOSIANE BUDNI  
Data: 12/05/2025 14:35:43-0300  
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

**Profa. Dra. JOSIANE BUDNI**  
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER  
Data: 07/04/2025 10:54:38-0300  
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

**Profa. Dra. FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER**  
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 TATIANI BELLETTINI DOS SANTOS  
Data: 04/04/2025 4:38:20-0300  
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

**Profa. Dra. TATIANI BELLETTINI**  
Membro Externo – UNESC/ES

TATIANA  
BARICHELLO:575343  
14968  
Assinado de forma digital por  
TATIANA  
BARICHELLO:57534314968  
Dados: 2025.04.01 19:12:45 -0300

**Profa. Dra. TATIANA BARICHELLO**  
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente  
 SAMIRA DA SILVA VALVASSORI  
Data: 12/05/2025 15:06:21-0300  
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

**Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Coordenadora Ajunta do PPGCS

## FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

## **AGRADECIMENTOS**

Chegar até aqui foi um desafio repleto de aprendizados, e esta jornada não teria sido possível sem o apoio de tantas pessoas especiais.

À minha família, meu porto seguro, que sempre esteve ao meu lado, comemorou comigo cada pequena conquista. Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo incentivo desde os primeiros passos da minha educação e pelo exemplo de dedicação e perseverança. Aos meus irmãos, pelo apoio e pelas palavras de encorajamento nos momentos em que a caminhada parecia mais árdua. Ao meu marido Alberto que me deu apoio necessário para eu trilhar meu caminho. Meu filho Otávio, que incentivava e participava dos estudos da mamãe.

Aos meus professores e orientadores, minha eterna gratidão pelo conhecimento transmitido, pela paciência e por acreditarem no meu potencial. Em especial, minha orientadora Tatiana Barichello, pelo direcionamento, pelas discussões enriquecedoras e pelo incentivo constante para que eu fosse além dos meus limites. Minha co-orientadora Jaqueline, que sempre esteve disponível para me auxiliar com muito carinho e paciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurologia Experimental, por compartilharem comigo não apenas o ambiente de trabalho, mas também o apoio mútuo, as ideias, as dúvidas e até mesmo as horas de descontração, que tornaram essa caminhada mais leve e inspiradora. Ao PPGCS-UNESC pela parceria com a UniRV. Meus colegas do Dinter pela parceria e união.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero muito obrigada!

## RESUMO

A meningite pneumocócica é uma grave infecção no sistema nervoso central, que causa intensa inflamação das meninges, sendo considerada uma condição com alto risco de vida e altas taxas de mortalidade. A resposta imune do hospedeiro aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo que as células imunes periféricas cheguem ao líquido cefalorraquidiano aumentando a produção e consequente deposição de detritos. O transporte da BHE e as depurações glinfáticas são mecanismos interdependentes, e a disfunção de ambos pode dificultar a depuração de solutos do cérebro para os linfonodos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a funcionalidade do sistema glinfático e sua relação com a disfunção cognitiva em longo prazo em modelo experimental de meningite pneumocócica. A atividade do sistema glinfático e parâmetros comportamentais foi avaliada após a indução de meningite em ratos Wistar adultos em 3 protocolos. Os animais receberam injeção na cisterna magna de 10  $\mu$ L de suspensão de *Streptococcus pneumoniae* ou LCR artificial para o grupo controle. Para avaliação do sistema glinfático, os ratos receberam, após a indução, injeção com 25  $\mu$ L de albumina mais azul de Evans (EBA) e foram eutanasiados em 4, 24 e 72 horas após a indução para coleta de soro e encéfalo. No segundo protocolo, os animais do grupo meningite receberam ceftriaxona e não houve injeção de EBA. Outros animais foram utilizados para o teste comportamental de habituação a campo aberto realizado após 10 dias após a indução. Como resultados, o grupo com meningite apresentou um comprometimento significativo do sistema glinfático ao reter o EBA nos compartimentos do LCR em comparação ao grupo controle, aumento de neuroinflamação e dano neuronal. Relacionada à perda da funcionalidade do sistema glinfático houve consequente acúmulo de componentes pneumocócicos, como a citotoxina Ply e a cápsula polissacarídica, no espaço subaracnóideo perivascular. Esses eventos podem culminar para o comprometimento cognitivo visualizado em 10 dias após o modelo experimental. Pela primeira vez verificou-se que o comprometimento do transporte de solutos entre o espaço subaracnóideo perivascular e o parênquima cerebral ocorre devido ao descolamento dos pés astrocíticos da BHE, com provável perda da função fisiológica dos canais de água AQP4 de transporte de soluto dentro do sistema glinfático.

**Palavras chaves:** sistema glinfático, meningite pneumocócica, dano cognitivo, inflamação.

## ABSTRACT

Pneumococcal meningitis is a serious infection of the central nervous system that causes inflammation of the meninges and is considered a life-threatening condition with high mortality rates. The host immune response increases the permeability of the blood-brain barrier, allowing peripheral immune cells to reach the cerebrospinal fluid, increasing the production and consequent deposition of debris. BBB transport and glymphatic clearance are interdependent mechanisms, and malfunction of both may hinder the clearance of solutions from the brain to the lymph nodes. The aim of the present study was to evaluate the functionality of the glymphatic system and its relationship with long-term cognitive dysfunction in an experimental model of pneumococcal meningitis. The activity of the glymphatic system and behavioral parameters were evaluated after induction of meningitis in adult Wistar rats in 3 protocols. The animals received injections of 10  $\mu$ L of *Streptococcus pneumoniae* suspension or artificial CSF in the cisterna magna for the control group. To evaluate the glymphatic system, the rats received, after induction, injection with 25  $\mu$ L of albumin plus Evans blue (EBA) and were euthanized at 4, 24 and 72 hours after induction for serum and brain collection. In the second protocol, the animals in the meningitis group received ceftriaxone and there was no EBA injection. Other animals were used for the open field habituation behavioral test performed 10 days after induction. As a result, the meningitis group showed a significant impairment of the glymphatic system by retaining EBA in the CSF compartments compared to the control group, increased neuroinflammation and neuronal damage. Related to the loss of functionality of the glymphatic system, there was a consequent accumulation of pneumococcal components, such as the cytotoxin Ply and the polysaccharide capsule, in the perivascular subarachnoid space. These events culminated in the cognitive impairment observed 10 days after the experimental model. For the first time, it was obtained that the impairment of solute transport between the perivascular subarachnoid space and the brain parenchyma occurs due to the detachment of astrocytic feet from the BBB, with the probability of loss of the physiological function of the AQP4 water channels for solute transport within the glymphatic system.

**Keywords:** glymphatic system, pneumococcal meningitis, cognitive impairment, inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação do sistema de drenagem do líquido intersticial. ISF, líquido intersticial; LCR, líquido cefalorraquidiano. ....	22
<b>Figura 2:</b> Representação do protocolo experimental 1. ....	26
<b>Figura 3:</b> Representação do protocolo experimental 2. ....	27
<b>Figura 4:</b> Representação do protocolo experimental 3. ....	27
<b>Figura 5:</b> Aparato para a avaliação do teste comportamental de campo aberto .....	28
<b>Figura 6:</b> Representação da injeção de EBA na cisterna magna .....	30
<b>Figura 7:</b> Funcionalidade do sistema glinfático prejudicada após meningite pneumocócica experimental. ....	36
<b>Figura 8:</b> Funcionalidade do sistema glinfático e alterações nos níveis de expressão de AQP4. ....	38
<b>Figura 9:</b> Acúmulo de Ply pneumocócica no LCR como consequência da disfunção do sistema glinfático .....	39
<b>Figura 10:</b> Acúmulo de cápsula de polissacarídeo no LCR devido a um mau funcionamento do sistema glinfático durante a meningite pneumocócica .....	40
<b>Figura 11:</b> Ply nos homogeneizados cerebrais de ratos após meningite pneumocócica .....	41
<b>Figura 12:</b> Presença, mas não acúmulo, da cápsula do sorotipo 3 no parênquima cerebral de ratos com meningite pneumocócica .....	42
<b>Figura 13:</b> Avaliação de IBA-1 durante a infecção pneumocócica com mau funcionamento do sistema glinfático .....	43
<b>Figura 14:</b> Aumento da neuroinflamação durante a infecção pneumocócica com um sistema glinfático prejudicado .....	44
<b>Figura 15:</b> Expressão de NSE no soro de ratos após modelo experimental de meningite pneumocócica. ....	45
<b>Figura 16:</b> Perda de conexões sinápticas neuronais e consequente comprometimento das funções neurológicas durante a meningite pneumocócica com mau funcionamento do sistema glinfático .....	45
<b>Figura 17:</b> Dados da tarefa de campo aberto 10 dias após a indução da meningite pneumocócica .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQP-4	Aquaporina-4
BHE	Barreira hematoencefálica
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa no Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COVID-19	Doença de coronavírus 19 (do inglês: <i>coronavirus disease 19</i> )
EB	Azul de Evans
EBA	Albumina e azul de Evans
ERO	Espécies reativas de oxigênio
i.p.	Intraperitoneal
IBA-1	Molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (do inglês: <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
ISF	Líquido intersticial
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MAP2	Proteína 2 associada a microtúbulos (do inglês: <i>microtubule-associated proteins</i> )
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês: <i>nuclear factor kappa B</i> )
NLR	Receptores NOD-likes (do inglês: <i>NOD-likes receptor</i> )
NO	Óxido nítrico
NSE	Enolase neurônio-específica (do inglês: <i>neuron-specific enolase</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês: <i>pathogen-associated patterns</i> )
PavA	Proteína de virulência e adesão pneumocócica A
PavB	Proteína de virulência e adesão pneumocócica B
PCVs	Vacinas polissacarídicas conjugadas
PLY	Pneumolisina
PRRS	Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês: <i>pattern recognition receptors</i> )
SINAN	Sistema de Informações e Agravos de Notificação

SNC	Sistema nervoso central
SPSS	Pacote Estatístico para a Ciência Social (do inglês: <i>Statistical Package for the Social Science</i> )
SpxB	Piruvato oxidase
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR	Receptor <i>Toll-like</i> (do inglês: <i>Toll-like receptor</i> )
TMEM119	Proteína transmembrana 119
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>tumour necrosis factor alpha</i> )
UFC	Unidades formadoras de colônias

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1. MENINGITE .....	14
1.2. EPIDEMIOLOGIA .....	14
1.3. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE .....	16
1.4. FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA.....	18
1.5. SISTEMA GLINFÁTICO.....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. TIPO DE ESTUDO.....	25
3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA .....	25
3.4. MODELO ANIMAL DE MENINGITE .....	25
3.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	26
3.6. TESTE COMPORTAMENTAL .....	28
<b>3.6.1. Habituação de campo aberto</b> .....	<b>28</b>
3.7. INJEÇÃO INTRACISTERNAL DE ALBUMINA AZUL DE EVANS .....	29
3.8. QUANTIFICAÇÃO DE EBA NO SORO E CÉREBRO .....	30
3.9. TESTES IMUNOQUÍMICOS .....	30
<b>3.9.1. Coloração de Coomassie e análise de Western blotting</b> .....	<b>30</b>
<b>3.9.2. Imunofluorescência</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9.3. Análise microscópica</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9.4. Quantificação do sinal de fluorescência e análise de co-localização</b> .....	<b>33</b>
3.10. DESCARTE DOS ANIMAIS.....	33
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 COMPROMETIMENTO DO SISTEMA GLINFÁTICO APÓS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA.....	35
4.2 PERDA DA INTERAÇÃO ASTROCÍTICA COM O ENDOTÉLIO VASCULAR BHE E MAU POSICIONAMENTO DOS CANAIS AQP4.....	36
4.3 COMPONENTES BACTERIANOS NO LCR E PARÊNQUIMA CEREBRAL .....	38

4.4 NEUROINFLAMAÇÃO, DANOS NEURONAL E COMPROMETIMENTO DAS FUNÇÕES NEUROLÓGICAS APÓS MENINGITE PNEUMOCÓCICA COM MAU FUNCIONAMENTO DO SISTEMA GLINFÁTICO .....	43
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA .....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. MENINGITE

A meningite é uma infecção no sistema nervoso central (SNC), mais especificamente nas membranas que envolvem o encéfalo e a medula espinhal, caracterizada pelo recrutamento e ativação de células inflamatórias para o líquido cefalorraquidiano (LCR) (Archibald, Quisling 2013). Pode ser definida como um processo inflamatório das membranas leptomeníngeas, principalmente da aracnoide e da pia-máter, bem como o espaço subaracnóideo (Costerus et al., 2017). Essa patologia pode ser desencadeada por diversos agentes infecciosos, incluindo bactérias, vírus, fungos, e não infecciosos, como medicamentos e neoplasias (Lucas et al., 2016).

Uma infecção bacteriana do SNC é uma condição com alto risco de vida e que possui alta taxa de mortalidade. A reação inflamatória gerada pode, não apenas envolver as meninges e o espaço subaracnóideo, mas também os vasos parenquimatosos do cérebro (vasculite) e o próprio parênquima, contribuindo para o desenvolvimento de lesão neuronal (Sellner et al., 2010, Fuentes-Antrás et al., 2019). Apesar dos progressos na prevenção e tratamento da meningite bacteriana adquirida na comunidade nas últimas três décadas, a carga da doença permanece elevada globalmente (van de Beek et al., 2021).

O quadro clínico clássico de sintomas da meningite bacteriana consiste em febre, rigidez na nuca e alteração do estado mental (Ter Horst et al., 2021), e mesmo com a eficácia das terapias antimicrobianas, as sequelas neurológicas estão presentes em 30 a 52% dos sobreviventes, que incluem perda auditiva, déficits neurológicos focais e comprometimento cognitivo (Mook-Kanamori et al., 2011).

### 1.2. EPIDEMIOLOGIA

As alterações do SNC em decorrência da meningite possuem alta prevalência e consequências socioeconômicas, como aumento dos custos em saúde, aumento de desemprego e aumento de institucionalização; e clínicas, como maior incidência de alterações cognitivas de moderada a severa, depressão, esquizofrenia e desordem de estresse pós-traumático (van de Beek et al., 2016).

No Brasil, a meningite é considerada uma doença endêmica. Casos da doença são esperados ao longo de todo o ano, com a ocorrência de surtos e epidemias ocasionais (Silva et al., 2021). Nos últimos 25 anos ocorreram mudanças nos dados epidemiológicos da doença; tais mudanças estão diretamente relacionadas com imunizantes conjugados do sorogrupo meningocócico C (MenC) e sorogrupo meningocócico A (MenA) (Acevedo et al., 2019), à proliferação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (van Aalst et al., 2018), expansão do uso de antimicrobianos, somado à prevenção da transmissão vertical de meningite (Hasperhoven et al., 2020).

A meningite representa um grande problema para o sistema de saúde pela sua magnitude, potencial de transmissão, patogenicidade e relevância social (Bijlsma et al., 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que, em todo o mundo, mais de 5 milhões de pessoas são acometidas pela meningite anualmente e destas, 1,2 milhão tem etiologia bacteriana (Organization 2021). Além disso, mundialmente, a meningite bacteriana causa, aproximadamente, 318.000 mortes por ano (van de Beek et al., 2021).

A incidência varia de aproximadamente 0,9 por 100.000 indivíduos por ano em países de alta renda e até 10 a 40 por 100.000 indivíduos por ano em países de baixa renda. As taxas de mortalidade em adultos e neonatos com meningite bacteriana variam de 6% a 54%. A mortalidade também varia de 10% em países de alta renda a até 58% em países de baixa renda. Os riscos de sequelas neurológicas, como déficits neurológicos focais, incluindo hemiparesia, neuropatias cranianas, perda auditiva e comprometimento da memória variam de 9,4% na Europa a 25% na África (Hasbun 2019).

Uma meta-análise de 61 estudos de 2012 a 2017 avaliou a prevalência de meningite bacteriana em diferentes pontos geográficas sendo divididos em região africana, região das américas, região do sudeste asiático, região europeia, região do mediterrâneo oriental [incluindo Israel] e região do pacífico ocidental e em diferentes faixas etárias. Esse estudo mostrou que os agentes etiológicos mais comuns foram *Neisseria meningitidis* médias ponderadas para frequência em regiões geográficas e faixas etárias variando de 3,2% a 47,0%, pacífico ocidental e Europa respectivamente, e *Streptococcus pneumoniae* variando em 9,6% (pacífico oriental) a 75,2% (região africana). As médias ponderadas para frequência de *Haemophilus*

*influenzae* em regiões geográficas, estratificadas por idade, variaram de 0,2% a 15,5% (Oordt-Speets et al., 2018).

No Brasil, as principais ocorrências de meningite bacteriana, de relevância para a saúde pública, são as causadas por *N. meningitidis* (meningococo), agente causador mais comum de meningite bacteriana, e *S. pneumoniae* (pneumococo) predominante de adultos e idosos (Parellada et al., 2023). Um estudo quantitativo e retrospectivo, realizado a partir de dados coletados sobre os casos notificados de meningite bacteriana registrados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), referentes ao período de 2009 a 2018, no Brasil, identificou 52.926 casos confirmados, entre as etiologias a meningite pneumocócica foi a mais frequente (19,9%) (Silva et al., 2021).

O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza vacinas contra os principais patógenos. Apesar disto, de acordo com o Ministério da Saúde, a taxa de incidência no Brasil é de 1,4 caso/100 mil habitantes/ano, com 22,2% de letalidade. Entre os anos de 2007 e 2020, foram notificados 393.941 casos de meningite no Brasil (Brasil 2018). A meningite viral é a mais frequente (121.955 casos), seguida pela etiologia bacteriana (87.993 casos). No estado de Santa Catarina, foram confirmados 891 casos de meningite em 2018, 970 em 2019, 379 em 2020 e 358 em 2021 (Brasil 2018). Essa redução no número de casos confirmados de meningite nos anos de 2020 e 2021 pode estar associada às medidas de distanciamento social, uso de máscara e higiene das mãos, em decorrência da pandemia de doença de coronavírus 19 (COVID-19) (Brasil 2018)

### 1.3. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Sendo o principal agente causador de pneumonia bacteriana, otite média e meningite, a bactéria *S. pneumoniae* é um grande problema de saúde global (Engholm et al., 2017). Mesmo quando a doença é diagnosticada precocemente e um tratamento adequado é iniciado, entre 5% e 10% dos pacientes não sobrevivem e acabam morrendo, normalmente, 24 ou 48 horas após o surgimento dos primeiros sintomas. Sem tratamento, até 50% dos casos podem resultar em morte (Hasbun 2019). Também conhecido como pneumococo, é um patógeno oportunista, extracelular e Gram-positivo, e na maioria dos indivíduos imunocompetentes, a via mais comum de infecção por *S. pneumoniae* é a colonização da nasofaringe, que

ocorre através da mucosa, além da invasão epitelial do trato respiratório superior (Weight et al., 2019).

A virulência dos pneumococos é altamente dependente de suas cápsulas polissacarídicas, constituindo mais de 90 sorotipos diferentes identificados (Fitzgerald, Waterer 2019). Sua distribuição local e regional pode diferir consideravelmente, sendo dependente da localização geográfica, população e período de tempo estudado (McCullers et al., 2010). Dois tipos de vacinas pneumocócicas são mais utilizadas atualmente, sendo estas a vacina polissacarídica pneumocócica não conjugada 23 valente e as vacinas polissacarídicas conjugadas (PCVs), que fornecem um melhor efeito protetor, especialmente em grupos de risco, como crianças pequenas de 3 meses a 3 anos (Subramanian et al., 2019).

A variabilidade na distribuição dos sorotipos e a eficácia das vacinas disponíveis se relacionam diretamente com a dinâmica da colonização do pneumococo. A colonização assintomática da nasofaringe é considerada um pré-requisito para infecções invasivas e as doenças pneumocócicas podem variar desde leves infecções nas mucosas do trato respiratório, como otite média e sinusite, até doenças mais graves, como pneumonia, septicemia e meningite (Henriques-Normark, Tuomanen 2013). O contágio requer contato próximo com um portador (especialmente crianças pequenas), sendo mais frequente durante os meses mais secos e frios, quando as secreções das vias aéreas são mais abundantes (Numminen et al., 2015).

De forma a obter acesso às superfícies epiteliais durante a colonização da nasofaringe, o microrganismo expressa uma cápsula que evita o seu aprisionamento na mucosa (Nelson et al., 2007). Sua cápsula polissacarídica é um dos mais importantes fatores de virulência capaz de limitar a ligação da imunoglobulina e complemento, dificultando a morte bacteriana mediada por fagocitose (Liechti et al., 2015). Além disso, outros fatores de virulência expressados pelo pneumococo desempenham papéis cruciais para a manutenção da vida do invasor sendo estes a toxina formadora de poros, pneumolisina (PLY), adesinas (proteína de virulência e adesão pneumocócica A, PavA, e proteína de virulência e adesão pneumocócica B, PavB), pili, piruvato oxidase (SpxB), protease IgA1 e exoglicosidases, que promovem sua sobrevivência no hospedeiro (Subramanian et al., 2019).

Durante a invasão, o patógeno se adere ao epitélio e, em seguida, migra para a corrente sanguínea, onde desencadeia a ativação dos sistemas de

complemento e de coagulação. A liberação de mediadores inflamatórios facilita a passagem da bactéria pela barreira hematoencefálica (BHE) para o cérebro, onde então se multiplica livremente e ativa células apresentadoras de antígenos circulantes e células gliais residentes (Barichello et al., 2011, Weight et al., 2019).

Os mediadores inflamatórios são liberados, incluindo citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio, moléculas neurotóxicas que contribuem para a ativação das células gliais e desencadeiam a neuroinflamação (Barichello et al., 2016, Giridharan et al., 2020). Além disso, resíduos tóxicos e detritos são liberados no LCR e no parênquima cerebral sendo necessário removê-los para manter a homeostase do SNC (Weight et al., 2019). A inflamação resulta, então, nas características clássicas da meningite bacteriana, incluindo pleocitose do LCR, dano coclear, edema cerebral, hidrocefalia e complicações cerebrovasculares (Mook-Kanamori et al., 2011).

#### 1.4. FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA

A BHE é uma estrutura especializada de permeabilidade seletiva que protege o SNC de substâncias potencialmente neurotóxicas e regula a homeostase cerebral, medula espinhal e LCR com o restante dos sistemas (Larsen et al., 2014). A barreira é formada pela presença das junções das células endoteliais que formam uma camada que reveste a superfície interior dos vasos sanguíneos e que controlam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula, portanto, para invadir o cérebro, os patógenos precisam atravessá-la (Abbott et al., 2010). A perda da integridade da BHE durante doenças neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, trauma cerebral e doenças neurodegenerativas, é um componente importante da patologia e progressão dessas doenças (Zlokovic 2008, Daneman 2012). O mesmo pode ser observado em doenças como sepse e meningite pneumocócica (Barichello et al., 2021, Gil et al., 2022).

Uma vez que o pneumococo obtém acesso ao SNC, devido à falta de defesas do hospedeiro no espaço subaracnóideo, passa a se multiplicar de forma relativamente desimpedida. Simultaneamente, ocorre lise bacteriana, por vezes em resposta à ação de antibióticos, com a liberação de seus componentes, como ácido lipoteicóico, peptidoglicano, DNA e fragmentos da parede celular, conhecidos como

padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (Barichello et al., 2013, van de Beek et al., 2016).

A inflamação desencadeada pela resposta imune do hospedeiro leva ao recrutamento de células imunes periféricas para o cérebro e para o LCR na tentativa de eliminar os patógenos invasores (Barichello et al., 2015). Essas células têm a função primária de internalizar e destruir micro-organismos e, para isso, expressam diversos receptores, como os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que atuam como sensores dos micróbios e detectam componentes da parede celular bacteriana, como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas e ácido lipoprotéico de bactérias Gram-positivas, além do DNA bacteriano (Rivera et al., 2016). Durante a meningite bacteriana, macrófagos residentes, astrócitos, células gliais e células endoteliais podem produzir citocinas, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórios em resposta à infecção (Loughran et al., 2019).

Os PAMPs são reconhecidos pelos PRRs, como os receptores *Toll-likes* (TLRs) e *NOD-likes* (NLR), fundamentais na indução da resposta imune inata pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), fator responsável pela produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1beta (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, iniciando uma cascata de mediadores inflamatórios, com a produção de outras interleucinas, quimiocinas, prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e ERO, bem como a cascata de complemento e a de coagulação (Mook-Kanamori et al., 2011, Barichello et al., 2013).

Estas citocinas, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, são consideradas as principais citocinas de resposta precoce, e estimulam a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, que desempenham um papel importante no influxo de leucócitos da circulação para o LCR (Heckenberg et al., 2014). Além disso, esses mediadores inflamatórios podem ser mensurados para avaliação de inflamação, bem como parâmetros de estresse oxidativo, para avaliação de lesão cerebral, que comprovadamente contribuem para isquemia cerebral e lesão neuronal necrótica e apoptótica em modelo animal de meningite. Os detritos derivados do hospedeiro e o próprio patógeno invasor, juntamente com quaisquer toxinas secretadas, são liberados no LCR e no parênquima cerebral e devem ser eficientemente eliminados do cérebro para recuperar a homeostase do SNC (Leib, Täuber 1999, Sellner et al., 2010).

Esses eventos inflamatórios criam um ambiente de ciclo vicioso entre o estresse oxidativo e inflamação sendo responsáveis por causar danos cerebrais como edema cerebral, aumento da pressão intracraniana, hipoxemia, além de problemas trombóticos e vasculite com a lesão neuronal e repercussões locais ou difusas, muitas vezes irreversíveis (Somand, Meurer 2009, Engelen-Lee et al., 2016).

## 1.5. SISTEMA GLINFÁTICO

No SNC, entre 32 e 40% do conteúdo total de água ocupa o espaço extracelular, podendo também ser dividido em líquido intersticial (ISF), que envolve as células do parênquima, LCR e compartimentos de sangue. Fora do SNC, os resíduos do metabolismo celular são direcionados pela pressão sanguínea e fluem pelo ISF que circunda as células, sendo eliminados dos tecidos pelo sistema linfático (Swartz et al., 2008, Jessen et al., 2015). O SNC é o único sistema de órgãos que não possui vasos linfáticos para auxiliar na remoção de resíduos metabólicos intersticiais, e, como resultado, desenvolveu adaptações exclusivas para eliminação de resíduos e equilíbrio de fluídos (Weller et al., 2009).

As células epiteliais do plexo coroide secretam LCR dentro dos ventrículos cerebrais drenando em última instância para o espaço subaracnóide ao redor do cérebro, que é considerado um coletor de resíduos intersticiais (Johanson et al., 2008). No entanto, como os metabólitos produzidos e liberados nos espaços extracelulares do cérebro finalmente são drenados para o compartimento subaracnóide do LCR permanece uma questão pouco compreendida (Louveau et al., 2018).

Os primeiros estudos da anatomia da depuração de resíduos cerebrais usaram moléculas traçadoras para identificar as vias do ISF e a drenagem de soluto do parênquima e esses solutos intersticiais não se moviam através do parênquima isotropicamente, mas eram drenados por vias preferenciais, especificamente os espaços perivasculares dos vasos sanguíneos cerebrais (Cserr 1974). As observações de que o ISF e LCR estavam se movendo em direções opostas dentro desta via de troca levaram à hipótese de que existem subconjuntos de espaços perivasculares especializados para efluxo de ISF ou influxo de LCR (Louveau et al., 2015).

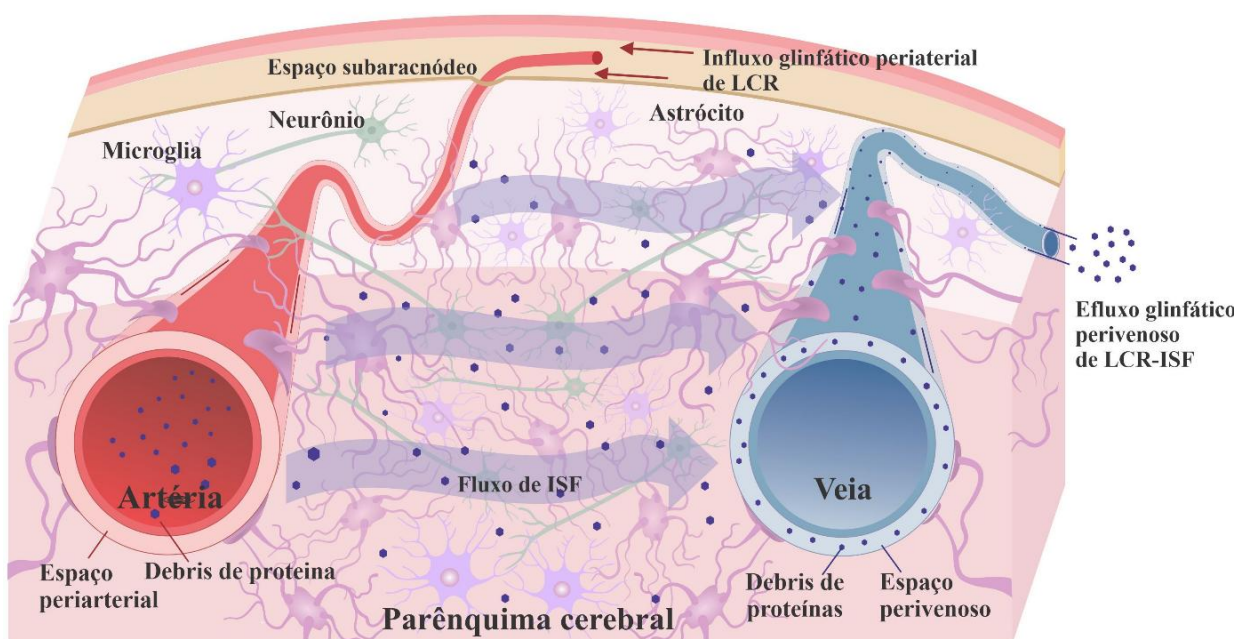
O sistema glinfático é caracterizado pela drenagem do LCR, ISF, moléculas derivadas do SNC e meninges para os linfonodos periféricos. Até a descoberta do sistema glinfático, era um paradoxo que o órgão responsável por algumas das maiores taxas de metabolismo energético nos mamíferos aparentemente não tivesse meios eficientes para remover o líquido extracelular e solutos. Um trabalho levou à descoberta do sistema glinfático, descrevendo uma rede perivascular dependente da glia que atende a uma função pseudolinfática no cérebro, agindo para captar o excesso de líquido e solutos parenquimatosos e devolvê-lo à circulação cardiovascular, além de coletar e fornecer antígenos aos linfonodos, agindo, assim, como um sistema de vigilância e liberação imunológica (Jessen et al., 2015).

Em uma tentativa de identificar as vias de entrada e liberação deste sistema, Iliff e colaboradores (2012) injetaram traçadores fluorescentes no LCR e estriado de ratos, e observaram que o traçador entrou no cérebro especificamente dentro dos espaços perivasculares de vasos indicativos de artérias, enquanto o traçador do ISF drenou do cérebro exclusivamente ao lado de veias de grande calibre. Além disso, verificou-se que os canais perivasculares de aquaporina-4 (AQP-4), densamente expressos nos pés dos astrócitos, desempenham um papel importante na facilitação do fluxo dessa via. Como resultado desta dependência dos canais astrocíticos AQP-4 e da função "linfática" esta via foi denominada de sistema linfático associado à glia, ou sistema glinfático (Iliff et al., 2013). Os canais de água AQP-4 são um componente fundamental do sistema glinfático, facilitando o transporte de solutos do espaço subaracnóide perivascular e do parênquima cerebral (Mestre et al., 2018, Harrison et al., 2020, Silva et al., 2021). A suprarregulação de expressão de AQP-4 foi previamente descrita na neuroinflamação em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Valenza et al., 2019) e a esclerose múltipla (Fukuda, Badaut 2012).

Durante o processo inflamatório, os canais AQP-4 podem ter sua polarização alterada e, conseqüentemente, células imunes infiltrantes se acumulam nos espaços perivasculares, levando ao bloqueio do influxo e fluxo de LCR (Mogensen et al., 2021). A despolarização dos canais AQP-4 também leva à diminuição da atividade glinfática, afetando posteriormente a troca LCR-ISF (Kress et al., 2014). Os canais de água AQP-4 desempenham um papel essencial na remoção de proteínas neurotóxicas do cérebro (Iliff et al., 2012). O sistema glinfático

e a BHE drenam proteínas neurotóxicas do espaço extracelular, ISF e LCR, onde também podem ser degradadas por proteases ou fagocitadas por micróglia e astrócitos (Boland et al., 2018).

Quando o sistema glinfático não possui a propriedade de remover os resíduos para fora do SNC, ocorre o acúmulo desses detritos no cérebro, aumentando a inflamação e dificultando a recuperação da doença. Muitas doenças têm sido associadas à disfunção do sistema glinfático, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, doença de Huntington e outras doenças neurodegenerativas (Boland et al., 2018). A neurodegeneração é caracterizada por morte neuronal progressiva associada ao acúmulo de formas aberrantes de proteínas celulares ou peptídeos com atividade neurotóxica. A remoção de proteínas e de outras macromoléculas é importante na manutenção da homeostase cerebral e está implicada em vários estados fisiológicos e fisiopatológicos (figura 1) (Afridi et al., 2022).



**Figura 1:** Representação do sistema de drenagem do líquido intersticial. ISF, líquido intersticial; LCR, líquido cefalorraquidiano. Figura elaborada pela autora, 2025.

A meningite bacteriana, apesar dos avanços em estratégias de vacinação e prevenção, continua sendo uma doença com grande impacto na saúde pública e consequências graves aos sobreviventes, como perda de audição, convulsões, déficits neurológicos, prejuízo de aprendizagem e perda de memória. A resposta inflamatória exacerbada que ocorre durante a infecção na meningite bacteriana leva

a distúrbios metabólicos e alterações na permeabilidade da BHE, permitindo a passagem de mediadores inflamatórios para o SNC. Como consequência há ativação das células gliais incluindo micróglia, disfunção neuronal, podendo resultar em disfunção do sistema glinfático, responsável pela proteção e limpeza de resíduos do SNC, e ao acúmulo cerebral de moléculas neurotóxicas. Desse modo, entender esses mecanismos é o primeiro passo para buscar uma solução e uma melhor qualidade de vida para a comunidade.

Nos últimos anos, a atenção do mundo científico tem-se centrado no sistema de depuração de metabólitos de resíduos cerebrais, o sistema glinfático. O comprometimento desse sistema é uma característica que está sendo estudada em diversas patologias e pode atuar como contribuinte para a lesão cerebral. Dessa forma, estudos que visem compreender alterações do sistema glinfático possuem grande relevância ao tentar elucidar as alterações fisiopatológicas responsáveis pelas sequelas em sobreviventes de meningite pneumocócica. Com isso, esse estudo poderá fornecer conexões que possibilitem associação entre o sistema glinfático e o potencial dano cognitivo, possibilitando, futuramente, tratamentos bem-sucedidos para um melhor prognóstico do paciente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a funcionalidade do sistema glinfático e sua relação com a disfunção cognitiva em longo prazo em modelo experimental de meningite pneumocócica.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade do sistema glinfático através dos níveis de albumina azul de Evans (EBA) e AQP-4 (microscopia confocal do endotélio vascular da BHE) no soro e cérebro de ratos Wistar adultos em 4, 24 e 72 horas após modelo animal de meningite experimental.

- Verificar o acúmulo de componentes bacterianos (PLY) e cápsula polissacarídica no LCR e parênquima cerebral em adultos em 4, 24 e 72 horas após modelo animal de meningite experimental.

- Avaliar a neuroinflamação através da expressão IBA-1, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e TMEM119 em 4, 24 e 72 horas no cérebro de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo animal de meningite experimental.

- Analisar o dano neuronal através da NSE no soro e a conexão sináptica neuronal no cérebro de animais submetidos ao modelo animal de meningite experimental.

- Avaliar os parâmetros de memória e aprendizagem de ratos Wistar adultos 10 dias após modelo animal de meningite pneumocócica.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental pré-clínico, utilizando modelo animal de meningite pneumocócica.

#### 3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Neurologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso Animal (CEUA) da UNESC sob o protocolo 73/2022 (anexo A), Brasil. Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos.

#### 3.3. MICRORGANISMO INFECTANTE PARA INDUÇÃO DE MENINGITE

O sorotipo III de *S. pneumoniae*, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado em 5 mL de meio de cultura Todd Hewitt Broth®, diluído em meio fresco e posteriormente cultivado até a fase logarítmica. A cultura foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm e ressuspensa em solução salina estéril a uma concentração de  $5 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) (Barichello et al., 2013).

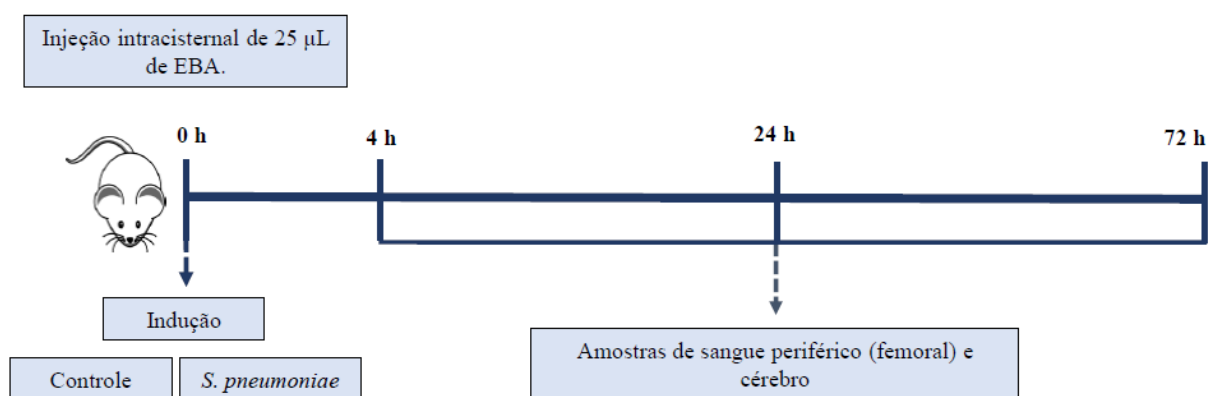
#### 3.4. MODELO ANIMAL DE MENINGITE

Foram utilizados ratos Wistar machos (60 dias de vida, 200 a 250 g de peso corporal), obtidos da colônia de criação da UNESC. Os animais foram mantidos em local fresco, em ciclo claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura de  $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , com comida e água sempre disponíveis *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com uma administração intraperitoneal (i.p.) de cetamina (6,6 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg) (Grandgirard, 2007 e Barichello, 2010). Os animais do grupo meningite receberam na cisterna magna 10  $\mu\text{L}$  de suspensão contendo  $5 \times 10^9$  UFC/ml de *S. pneumoniae* e os animais do grupo controle 10  $\mu\text{L}$  de LCR artificial.

Ambos os grupos receberam reposição volêmica após o procedimento e foram devolvidos às suas gaiolas. A meningite foi confirmada pela incubação de uma cultura quantitativa de 5  $\mu$ L de LCR a 37 °C com 5% de CO<sup>2</sup> em ágar sangue de carneiro (Simões, 2017). Os animais destinados aos testes comportamentais iniciaram, em 18 horas após a indução do modelo, o tratamento com ceftriaxona (100 mg/kg, i.p., 2 vezes por dia, por 07 dias). Dez dias após a indução da meningite pneumocócica, os animais foram submetidos ao teste comportamental de habituação ao campo aberto. Para esse estudo foram utilizados 93 ratos Wistar adultos.

### 3.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS

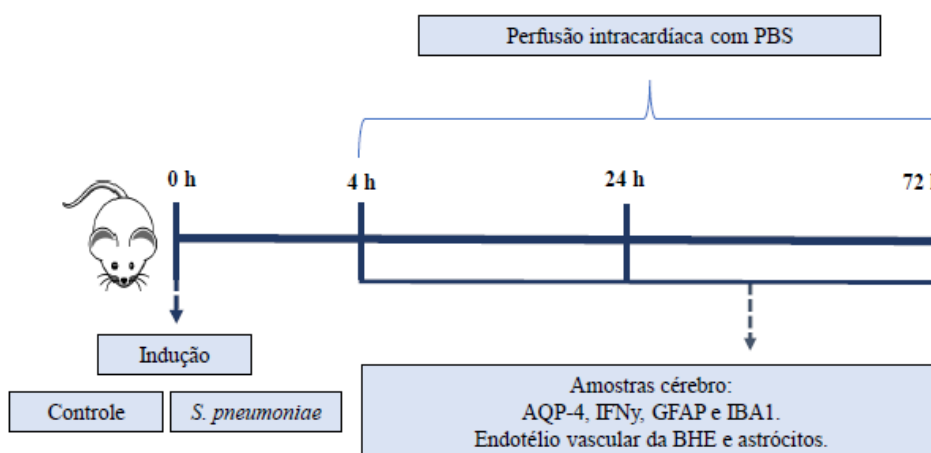
**Protocolo 1:** para avaliação da função do sistema glinfático, os animais foram divididos em 2 grupos: meningite (n = 20, divididos em 05 animais vivos em cada tempo e já considerando 30% de mortalidade) e controle (n = 15, divididos em 05 animais em cada tempo). Imediatamente após a indução da meningite, os animais receberam, na cisterna magna, 25  $\mu$ L de solução de albumina e azul de Evans (EBA). As amostras de sangue periférico e cérebro foram coletadas em 4, 24 e 72 horas após a indução da meningite e injeção de EBA (figura 2).



**Figura 2:** Representação do protocolo experimental 1. Figura elaborada pela autora, 2025.

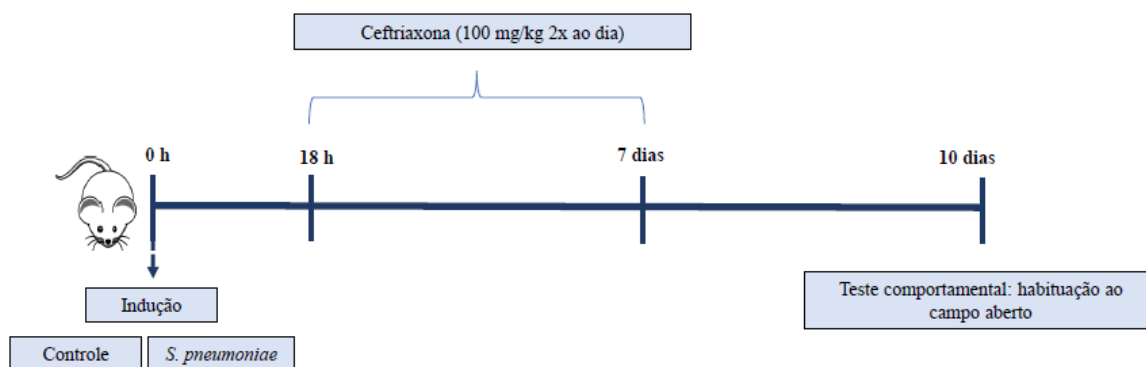
**Protocolo 2:** Os animais foram divididos em 2 grupos: meningite (n = 20, divididos em 05 animais vivos em cada tempo e já considerando 30% de mortalidade) e controle (n = 15, divididos em 05 animais vivos em cada tempo).

Nesta etapa não houve a injeção de EBA, mantendo-se os tempos de 4, 24 e 72 horas. Após os tempos pré-determinados, os animais foram perfundidos transcardialmente com PBS e o cérebro coletado para realizar a análise de AQP-4, INF- $\gamma$ , IBA-1; microscopia confocal do endotélio vascular da BHE (figura 3).



**Figura 3:** Representação do protocolo experimental 2. Figura elaborada pela autora, 2025.

**Protocolo 3:** para o teste comportamental os animais foram divididos em grupo controle (n = 10) e grupo meningite (n = 13, 10 vivos para o experimento + 3 animais considerando 30% de mortalidade) (figura 4).

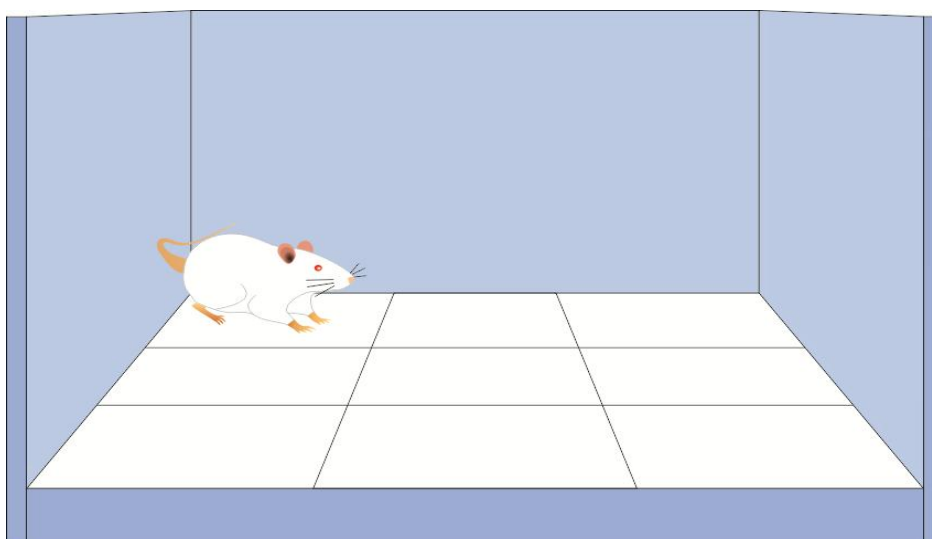


**Figura 4:** Representação do protocolo experimental 3. Figura elaborada pela autora, 2025.

## 3.6. TESTE COMPORTAMENTAL

### 3.6.1. Habituação de campo aberto

Esse teste comportamental serviu para avaliar as atividades locomotoras e memória e foi realizado no aparato de campo aberto. O aparelho mede 40 cm x 60 cm de campo aberto cercado por 50 cm de parede feita de madeira com um vidro frontal. O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas (figura 5). Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por 5 min (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados novamente para a sua gaiola e 24 h depois foram submetidos a uma nova sessão no aparelho de campo aberto (sessão teste). Durante 5 min, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal cruzou as linhas pretas (*crossings*) ou se apoiou com as patas traseiras levantando as dianteiras, atividade exploratória (*rearings*). A diminuição do número *crossings* e *rearings* entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

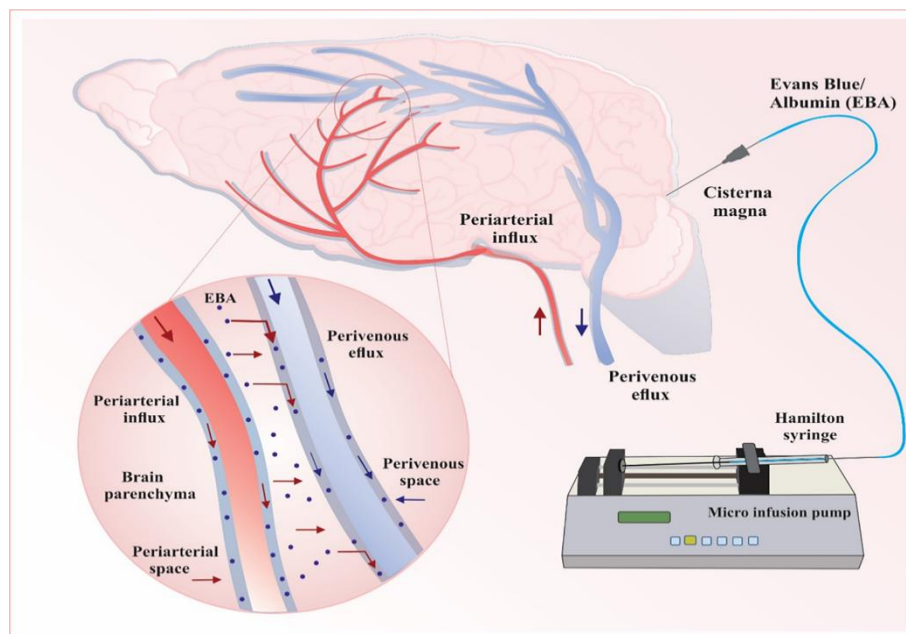


**Figura 5:** Aparato para a avaliação do teste comportamental de campo aberto. Laboratório de Neurologia Experimental, 2022.

### 3.7. INJEÇÃO INTRACISTERNAL DE ALBUMINA AZUL DE EVANS

Os animais foram submetidos à técnica de injeção via cisterna magna de Evans blue + albumina (EBA) para avaliação do funcionamento do sistema glinfático. Às 4, 24 e 72 horas após a injeção de EBA foram coletadas amostras sanguíneas através da artéria femoral e isolado o soro e encéfalo para quantificação de EBA.

O Evans blue (EB) é um corante com propriedades fluorescentes (excitação 620 nm e emissão 680 nm) e colorimétricas. Liga-se com alta afinidade à albumina (Saria e Lundberg, 1983), e relatos anteriores demonstraram que a albumina radiomarcada com azul de Evans quando injetados no parênquima cerebral, migram e se concentram nos espaços perivasculares, vasos linfáticos no pescoço e linfonodos cervicais (Bradbury, 1981 e Ichimura, 1991). A solução a 1% de EBA foi preparada com 100 mg de azul de Evans (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 100 mg de albumina de rato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluídos em 10 mL de LCR artificial (LCRa) (Abbott, 2006). Uma agulha dental 30G foi inserida em uma extremidade de um tubo PE10 de 30 cm e conectada à outra extremidade do tubo a uma seringa Hamilton de 100  $\mu$ L. Em seguida, a cânula foi preenchida com 30  $\mu$ L de solução de EBA. Na sequência, a seringa foi acoplada à bomba de microinfusão (figura 6). O animal previamente anestesiado foi colocado no estereotáxico sobre uma almofada de aquecimento e a cabeça fixada no aparelho com o nariz do rato levemente apontado para baixo. A agulha da cânula foi inserida (aproximadamente 1 a 2 mm) no centro da cisterna magna e foi iniciada a injeção de EBA utilizando a bomba de seringa de microinjeção a uma taxa de 1  $\mu$ L por minuto por 25 min, resultando em um volume total injetado de 25  $\mu$ L de solução de EBA a 1% (Wolf, 2019).



**Figura 6:** Representação da injeção de EBA na cisterna magna. Adaptado de (Generoso et al., 2022).

### 3.8. QUANTIFICAÇÃO DE EBA NO SORO E CÉREBRO

Às 4, 24 e 72 horas após a indução da meningite e injeção da solução de EBA na cisterna magna, o sangue foi coletado da artéria femoral e centrifugado por 10 min a  $2000 \times g$  para isolar o soro. Os ratos foram eutanasiados por decapitação sob anestesia e os cérebros colocados em 3 mL de formamida (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) por 72 horas para permitir que o EBA se difunda do tecido cerebral. Os cérebros foram removidos e a formamida armazenada a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até a avaliação espectrofotométrica. A concentração de EBA foi medida no soro e na solução de formamida. Ambas as amostras foram avaliadas por espectrofotometria (620 nm) (Ramos, 2019).

### 3.9. TESTES IMUNOQUÍMICOS

#### 3.9.1. Coloração de *Coomassie* e análise de *Western blotting*

Os cérebros foram homogeneizados em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação contendo inibidores de protease e fosfatase usando um filtro de células com um filtro de poro de 100 mm (Falcon). Homogeneizados de cérebro, bem como LCR, amostras de soro, Ply purificado, e a cultura líquida de *S.*

*pneumoniae* tipo 3 em uma densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0,5 foram misturados com tampão de amostra 1 x dodecil sulfato de lítio (Thermo Fisher Scientific) e fervidos a 95 °C por 5 min. Amostras de proteína (homogeneizados cerebrais, amostras de LCR ou soro e proteínas purificadas) foram carregadas em géis NuPage Novex 4 a 12% Bis-Tris SDS-PAGE (Thermo Fisher Scientific), a eletroforese foi realizada usando Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific) e o eletroblotting foi realizado em membranas de difluoreto de polivinilideno (Novex, Life Technologies) usando o Mini Blot Module (Thermo Fisher Scientific). Ply, enolase neurônio-específica (NSE), IBA-1, IFN- $\gamma$ , proteína transmembrana 119 (TMEM119) e AQP-4 foram detectados usando, respectivamente, um anticorpo anti-Ply de camundongo (Abcam), um anticorpo anti-NSE de coelho (Merck), um anticorpo anti-IBA-1 de cabra (Abcam), um anticorpo IFN- $\gamma$  de coelho (Abcam), um anticorpo anti-TMEM119 de coelho (Thermo Fisher) e um anticorpo anti-AQP-4 de coelho (Abcam). Todos os anticorpos primários foram diluídos 1:1.000 em PBS–0,1% *Tween* (PBST); os anticorpos secundários usados foram anti-camundongo de cabra conjugado com peroxidase de rábano (HRP), anti-coelho de cabra e anti-cabra de burro (Thermo Fisher Scientific), todos diluídos 1:5.000 em PBST. As bandas de proteína foram detectadas pela incubação de membranas com reagentes de detecção de *Western blotting ECL Prime* (Cytiva, Thermo Fisher Scientific) e imagens usando *ImageQuantLAS 4000* (GE Healthcare). Para coloração de *Coomassie*, após a eletroforese, os géis foram incubados com coloração de proteína de *Coomassie InstantBlue* (Abcam) por 15 min e então fotografados. A intensidade das bandas de proteína em membranas de PVDF foi medida pelo ImageJ, conforme descrito anteriormente (Iovino et al., 2016). As porcentagens de expressão de proteína foram calculadas como uma razão entre a intensidade da banda de proteína dividida pelo conteúdo total de proteína (após a coloração de *Coomassie*) medido pelo ImageJ em cada faixa específica do gel/membrana: o mesmo volume de lisado de proteína foi carregado em géis para coloração de *Coomassie* para realizar a quantificação do conteúdo total de proteína em cada amostra e em um gel separado para detecção de proteína por *Western blotting*.

### **3.9.2. Imunofluorescência**

Às 4, 24 e 72 horas após a indução da meningite, os animais foram anestesiados com cetamina (6,6 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg). Após, os animais foram perfundidos transcardialmente com PBS e eutanasiados por decapitação e os cérebros removidos, imediatamente embebidos em Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific) e armazenados em freezer -80 °C. Seções coronais de 20 µm de espessura de cérebros de ratos congelados embebidos em Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific) foram cortadas e coletadas em lâminas Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific). Os cortes foram fixados com acetona por 10 minutos, secos, as bordas dos cortes marcadas com caneta PAP (Avantor, VWR) e incubadas com os respectivos anticorpos (cápsula sorotipo 3 de coelho, proteína 2 associada a microtúbulos (MAP2), lectina, proteína tau, AQP-4). As incubações com anticorpos primários foram realizadas durante duas horas à temperatura ambiente, as incubações com anticorpos secundários realizadas durante duas horas à temperatura ambiente no escuro. A faixa de diluição dos anticorpos primários foi de 1:50-1:200, a faixa de diluição dos anticorpos secundários foi de 1:500-1:1000, ambos os anticorpos primários e secundários foram diluídos usando PBS 1% de albumina de soro bovino (BSA). Todas as amostras foram bloqueadas com PBS com 5% de albumina de soro bovino (Sigma Aldrich) por 15 minutos em temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento de coloração. Todos os anticorpos foram diluídos de acordo com as recomendações dos fabricantes usando PBS com 1% BSA e as lâminas lavadas em PBS três vezes por 5 minutos entre as incubações de anticorpos primários e secundários. As lâminas foram finalmente montadas usando ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), e lamínulas foram adicionadas.

### **3.9.3. Análise microscópica**

Todas as amostras coradas foram fotografadas usando um microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 com câmera Orca-Flash4.OLT. Para imagens com maior ampliação do endotélio vascular da BHE e astrócitos (anticorpo anti-GFAP), foi utilizada uma objetiva de 63X combinada com a função "Stacks" do

programa de imagem Zen 2, cada imagem tirada foi uma mesclagem de 15-20 pilhas de imagens. A análise de microscopia confocal foi realizada usando um sistema confocal Zeiss LSM980-Airy2; para a aquisição das imagens foi utilizado o programa ZEN lite (Zeiss), enquanto a modelagem 3D após a aquisição das imagens foi realizada no Imaris (Oxford Instruments). Durante a imagem de microscopia confocal, cada imagem z-stack incluiu 15 pilhas de uma espessura total de 15  $\mu\text{m}$ . Para a análise da microscopia com objetivas de alta ampliação, tanto a microscopia de fluorescência comum quanto a microscopia confocal, foi focado no septo, no tecido entre a área abaixo do espaço subaracnóideo e a parte mais externa do córtex cerebral.

#### **3.9.4. Quantificação do sinal de fluorescência e análise de co-localização**

As pós-colorações de sinal de fluorescência foram quantificadas usando o *software Image J* como descrito anteriormente (Iovino, 2017). Resumidamente, todas as imagens de fluorescência foram convertidas em imagens em tons de cinza, e então usando a função "Threshold", a superfície coberta pelo sinal de fluorescência foi definida com a função "Create Selection" e finalmente quantificada usando a função "Measure". Para análise de co-localização, os sinais de fluorescência de lectina de tomate e astrócitos (corados com anticorpo anti-GFAP) foram analisados para co-localização usando o *plugin* "Co-localization", que transforma todos os sinais co-localizados na cor branca; a superfície coberta pela cor branca co-localizada foi então medida usando a função "Measure".

#### **3.10. DESCARTE DOS ANIMAIS**

Os animais foram decapitados por guilhotina, sob anestesia de uma solução de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) administrados por via intraperitoneal. O método de decapitação é considerado um método restrito de eutanásia pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), publicadas em 2013. Foi utilizado um saco branco leitoso com a identificação de material infectante para descarte e armazenamento da carcaça, que foi depositado no freezer do biotério da

universidade para serem posteriormente transportados por empresa terceirizada. Desse modo, os resíduos foram tratados e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

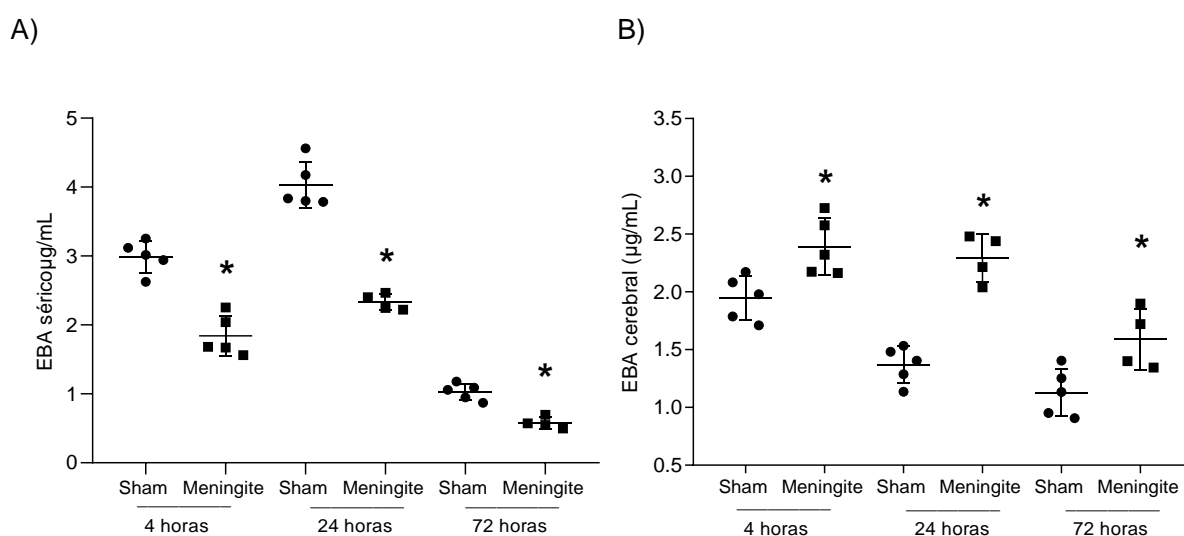
### 3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

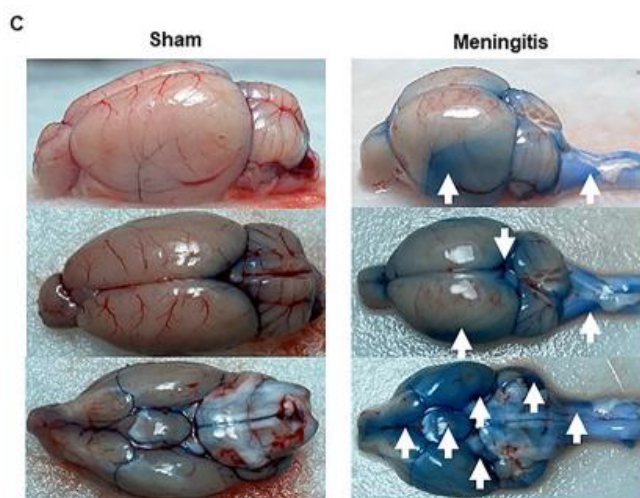
Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de *Shapiro-Wilk* e para homogeneidade usando o teste de *Levene*. Para as análises da função do sistema glinfático e demais marcadores os dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste t de *Student* não pareado. Para todas as comparações múltiplas, foi usada análise de variância (ANOVA) para avaliar a presença de diferenças entre os grupos e, em seguida, foi aplicado um teste de Dunn para comparações pareadas. Os dados da tarefa de habituação ao campo aberto foram relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e a comparações dentre os grupos feitas utilizando-se teste t de *Student* pareado. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de *Wilcoxon*. Os resultados estatisticamente significativos foram indicados por  $p < 0,05$ . Para as análises foi utilizado o software *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0 e os gráficos construídos no software *Graph Pad* versão 7.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 COMPROMETIMENTO DO SISTEMA GLINFÁTICO APÓS A MENINGITE PNEUMOCÓCICA

Através da administração intracisternal de EBA em modelo experimental de meningite pneumocócica foi investigada a funcionalidade do sistema glinfático durante o processo infeccioso no SNC. Foram medidos os níveis de EBA no soro de animais submetidos à meningite pneumocócica, sendo 5 animais para cada grupo, às 4, 24 e 72 horas de infecção. O grupo meningite apresentou diminuição dos níveis séricos de EBA, em todos os tempos, em comparação com o grupo controle, demonstrando que os animais apresentaram comprometimento do sistema glinfático (figura 7A). Inversamente, na medição do conteúdo de EBA cerebral, verificou-se que nos grupos meningite houve aumento significativo na retenção de EBA cerebral quando comparado ao controle em todos os tempos (figura 7B). Notavelmente, esses dados vão ao encontro do observado na figura 7C, onde é mostrado que nos cérebros dos ratos do grupo meningite o acúmulo de EBA foi detectado em toda a camada externa do espaço subaracnóideo, bem como no cerebelo, onde o LCR do quarto ventrículo é produzido, e no canal espinhal, onde o LCR entra no quarto ventrículo.



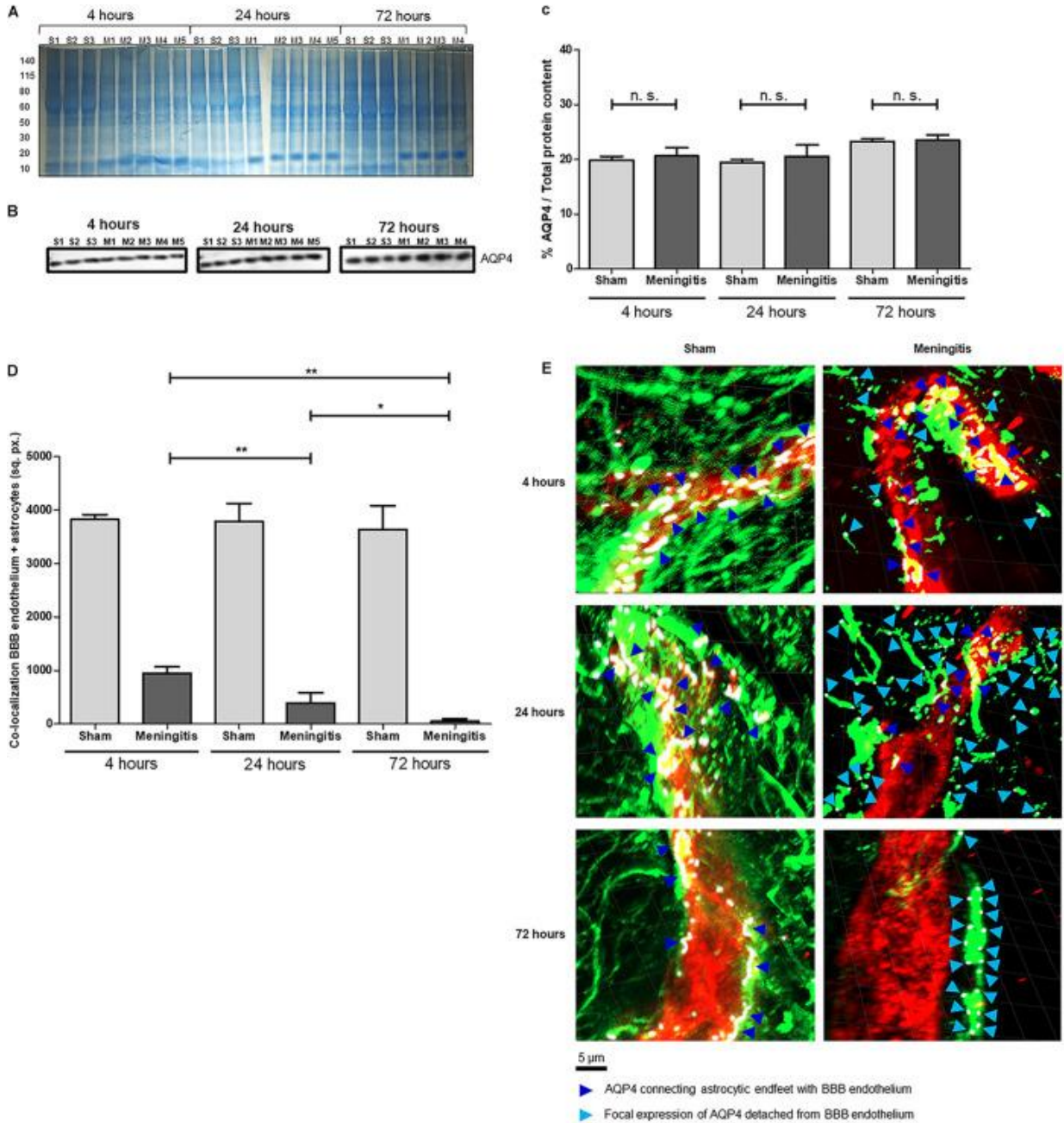


**Figura 7:** Funcionalidade do sistema glinfático prejudicada após meningite pneumocócica experimental. Trânsito de EBA da cisterna magna para o soro (A) e da cisterna magna para o cérebro (B) de ratos Wistar adultos às 4, 24 e 72 h após a indução da meningite pneumocócica. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. \* $p < 0,05$  significância estatística em comparação com o grupo controle ( $n = 5$ ). (C) Corante EBA retido nos cérebros dos grupos de controle e meningite 4 horas após a aplicação. Imagens de um cérebro por grupo são mostradas como representantes de ambos os grupos, e as imagens apresentam três perspectivas diferentes (lateral, superior e traseira). As setas brancas apontam para os compartimentos do LCR do cérebro com alta retenção de EBA. Figura elaborada pela autora, 2025.

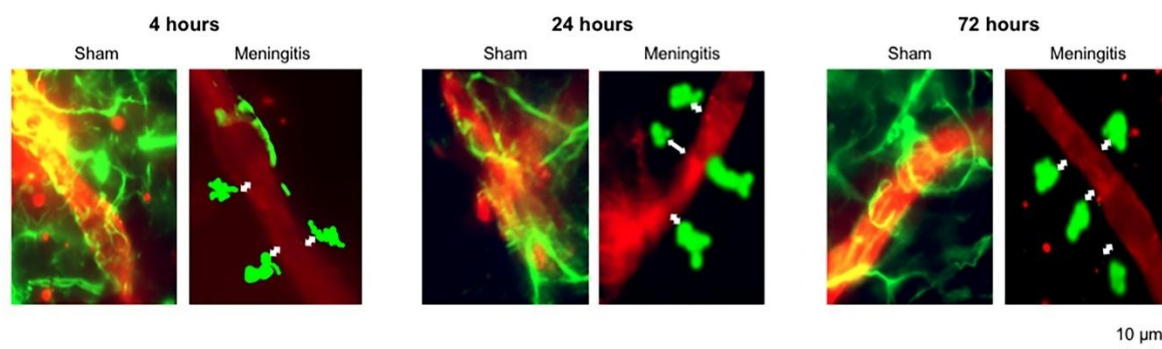
#### 4.2 PERDA DA INTERAÇÃO ASTROCÍTICA COM O ENDOTÉLIO VASCULAR BHE E MAU POSICIONAMENTO DOS CANAIS AQP4

Na análise cerebral através da técnica de *Western blotting*, 5 animais para cada grupo experimental, mostrou-se que, após a meningite pneumocócica experimental, os níveis de proteína AQP4 não são alterados, comparando com o tecido cerebral controle ao longo do tempo (figura 8A a C). O aumento do descolamento dos pés astrocíticos da extremidade da BHE foi confirmado pela análise de co-localização, que mostrou que a conexão entre os pés da extremidade astrocítica e BHE é perdida com o tempo e durante o curso da infecção pneumocócica, a retração progressiva dos processos celulares astrocíticos causa o deslocamento do AQP4 (figura 8D e E). Além disso, verificou-se que no cérebro dos animais do grupo controle com um sistema glinfático funcional, a expressão de AQP4 é expressa de forma homogênea ao longo da área entre os pés astrocíticos e o endotélio vascular BHE. Já nos cérebros de ratos afetados por meningite o sistema glinfático demonstrou mau funcionamento, cuja expressão de AQP4 foi focal em células astrocíticas e longe de qualquer co-localização com o endotélio de BHE (figura E). Houve ainda processos de astrogliose, no decorrer do processo

infeccioso, com astrócitos reativos, que retraíram seus processos celulares após a neuroinflamação, e mostraram um descolamento progressivo dos pés astrocíticos do endotélio vascular da BHE (figura F).



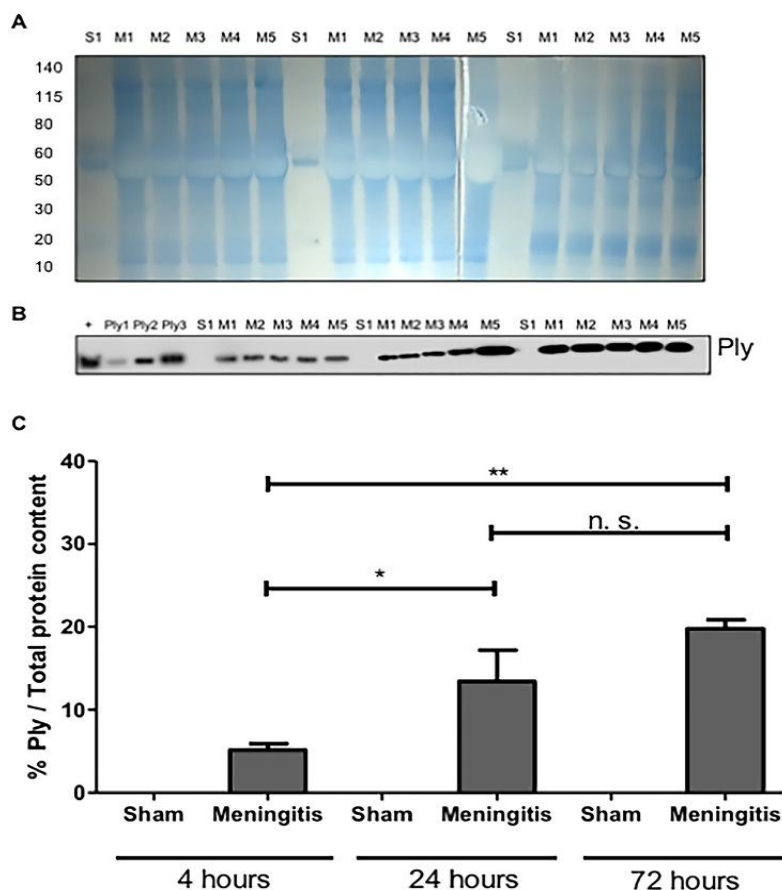
F



**Figura 8:** Funcionalidade do sistema glinfático e alterações nos níveis de expressão de AQP4. A) O conteúdo total de proteína das amostras de homogeneizado cerebral foi medido após a coloração de *Coomassie*. S (controle), M (meningite). Os números de 1 a 5 referem-se ao número de ratos no grupo (controle ou meningite) por tempo. (B) Detecção de AQP4 em amostras homogeneizadas cerebrais de grupos controle e meningite por *Western blotting*. (C) A porcentagem de AQP4 / conteúdo de proteína total foi calculada usando *ImageJ*, e os dados são mostrados como média e desvio padrão. (D) Quantificação da área de co-localização (em pixels quadrados [px.]) entre o endotélio vascular da BHE e os astrócitos medido com *ImageJ*. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . (E) Análise de microscopia confocal do endotélio vascular BHE (vermelho), astrócitos (verde) e AQP4 (roxo, renderizado em branco usando o programa de imagem ZEN lite). As setas azuis escuras apontam para o sinal fluorescente AQP4 conectando os pés astrocíticos com o endotélio vascular de BHE, enquanto as setas azuis claras apontam para a expressão focal de AQP4 em astrócitos desprendidos do endotélio da BHE. Quatro seções de tecido cerebral de três ratos controles e quatro ratos meningites foram analisadas em diferentes tempos, e três imagens por seção foram tiradas. As imagens exibidas são representativas de cada grupo. As imagens planas foram anguladas 30° a partir da posição horizontal no eixo z usando Imaris. Figura elaborada pela autora, 2025.

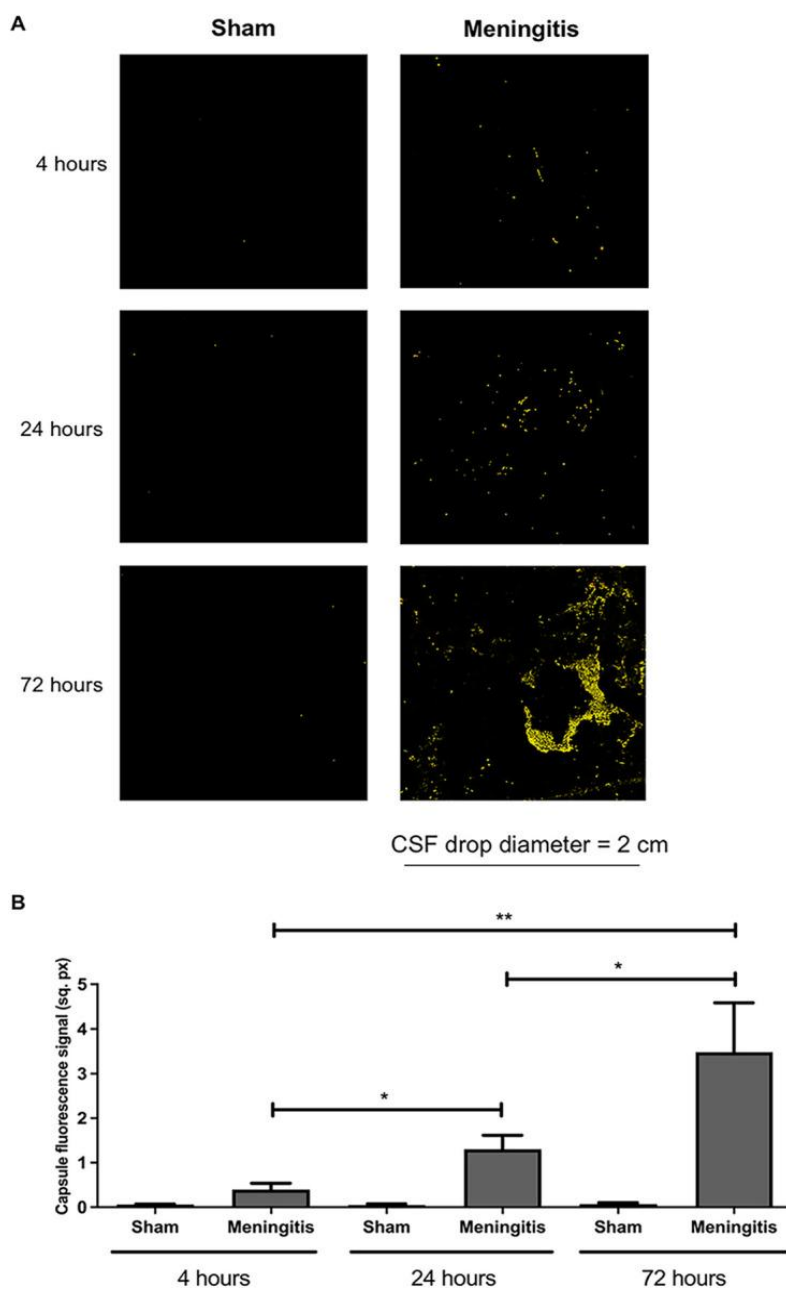
#### 4.3 COMPONENTES BACTERIANOS NO LCR E PARÊNQUIMA CEREBRAL

Para verificar a presença de pneumococos no LCR dos animais submetidos ao modelo experimental, 5 animais de cada grupo tiveram os níveis proteicos de Ply mensurados, sendo essa a principal citotoxina liberada pelos pneumococos, foram mensurados por *Western blotting*. Houve um aumento significativo nos níveis de Ply detectado no LCR dos animais meningite em 4, 24 e 72 horas (figura 9A, B e C).



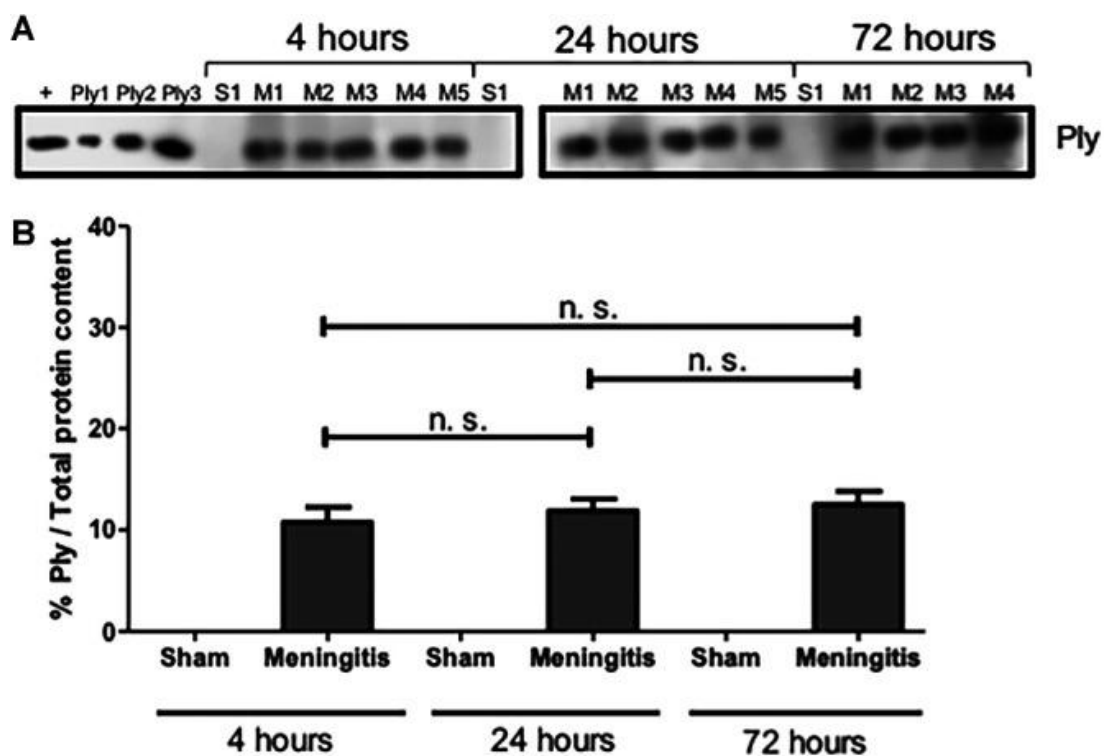
**Figura 9:** Acúmulo de Ply pneumocócica no LCR como consequência da disfunção do sistema glinfático. (A) O conteúdo total de proteína das amostras de LCR foi avaliado pela coloração de *Coomassie*. S (controle), M (meningite) Os números de 1 a 5 referem-se ao número de ratos no grupo (controle ou meningite) em diferentes tempos. (B) O mesmo volume das mesmas amostras foi usado para análise de *Western blotting* para a detecção de Ply; um lisado bacteriano de *S. pneumoniae* foi usado como controle positivo (+) juntamente com três quantidades seriadas de Ply purificado. (C) A porcentagem de Ply/conteúdo de proteína total foi calculada usando *ImageJ*. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n.s., não significativo. Figura elaborada pela autora, 2025.

Na análise de microscopia de imunofluorescência das amostras de LCR foi verificado um aumento significativo no sinal fluorescente para a cápsula polissacarídica do sorotipo 3 ao longo dos diferentes tempos de 4, 24 e 72 horas. Enquanto, as amostras de LCR não infectadas não demonstraram nenhum sinal de fluorescência para cápsula pneumocócica (figura 10 A e B).

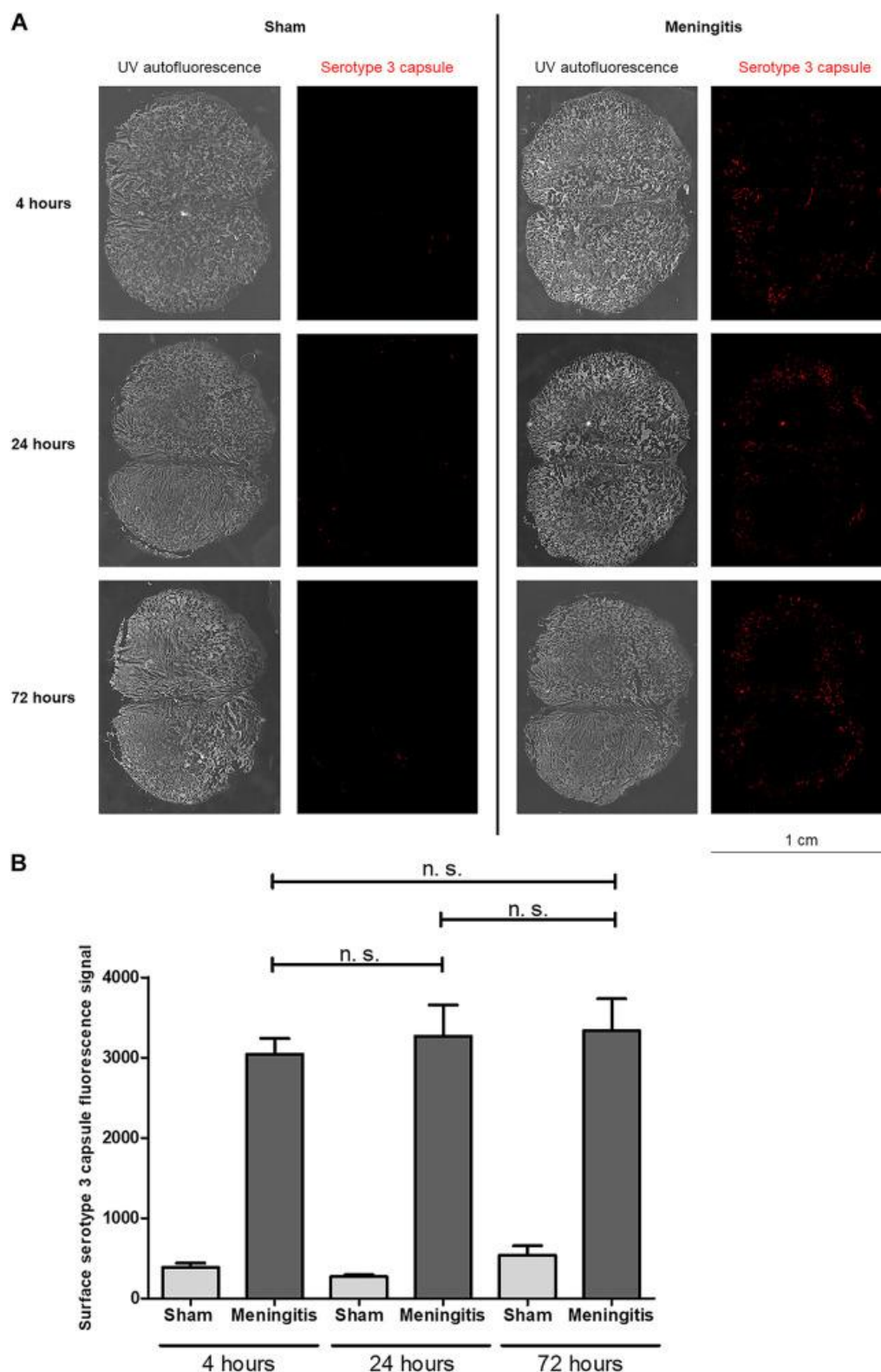


**Figura 10:** Acúmulo de cápsula de polissacarídeo no LCR devido a um mau funcionamento do sistema glnfático durante a meningite pneumocócica. (A) Gotas de LCR em lâminas de vidro foram coradas para cápsula polissacarídica do sorotipo 3 (vermelho). Uma imagem representativa é mostrada por grupo. (B) Quantificação do sinal de fluorescência da cápsula pneumocócica corada. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Figura elaborada pela autora, 2025.

Ao analisar a presença de bactérias no parênquima cerebral foi verificado um aumento de Ply nos homogenatos cerebrais, porém sem diferença significativa, nos diferentes tempos analisados, tanto pela técnica de *Western blotting* (figura 11 A e B) bem como pela análise por microscopia de imunofluorescência das seções de tecido cerebral (figura 12 A e B).



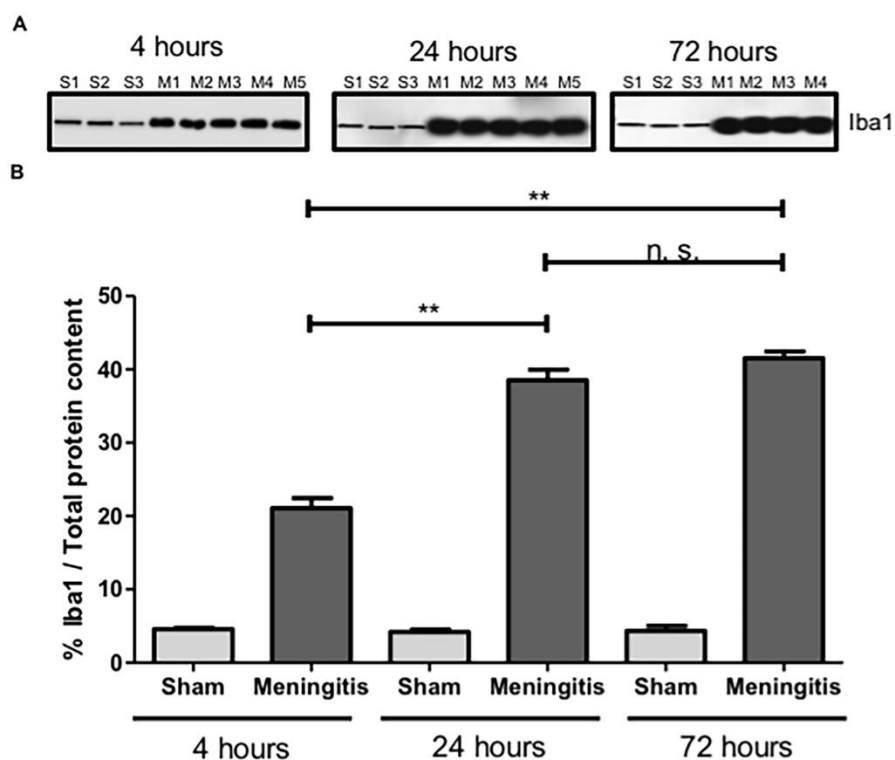
**Figura 11:** Ply nos homogeneizados cerebrais de ratos após meningite pneumocócica. (A) Detecção de Ply em amostras de homogeneizado cerebral através da técnica de Western blotting. Um lisado bacteriano de *S. pneumoniae* foi usado como controle positivo (+) juntamente com três quantidades seriadas de Ply purificado. Como controle negativo, amostras de homogeneizado cerebral de três ratos do grupo controle em diferentes tempos foram analisadas. (B) A porcentagem de Ply/conteúdo de proteína total foi calculada usando *ImageJ*. O teor total de proteína foi medido após a coloração de *Coomassie*. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. n.s., não significativo. Figura elaborada pela autora, 2025.



**Figura 12:** Presença, mas não acúmulo, da cápsula do sorotipo 3 no parênquima cerebral de ratos com meningite pneumocócica. (A) As seções de tecido cerebral foram coradas para a cápsula de polissacarídeo do sorotipo 3 (vermelho) e foram visualizadas com autofluorescência sob luz UV. Nos diferentes tempos, 4, 24 e 72h, seções de tecido de um rato controle e três ratos do grupo meningite foram analisadas no total. Uma imagem representativa é mostrada por grupo (controle ou meningite) por tempo. (B) Quantificação do sinal de fluorescência da cápsula pneumocócica corada no painel A. Os dados são mostrados como média e desvio padrão. n.s., não significativo. Figura elaborada pela autora, 2025.

#### 4.4 NEUROINFLAMAÇÃO, DANOS NEURONAL E COMPROMETIMENTO DAS FUNÇÕES NEUROLÓGICAS APÓS MENINGITE PNEUMOCÓCICA COM MAU FUNCIONAMENTO DO SISTEMA GLINFÁTICO

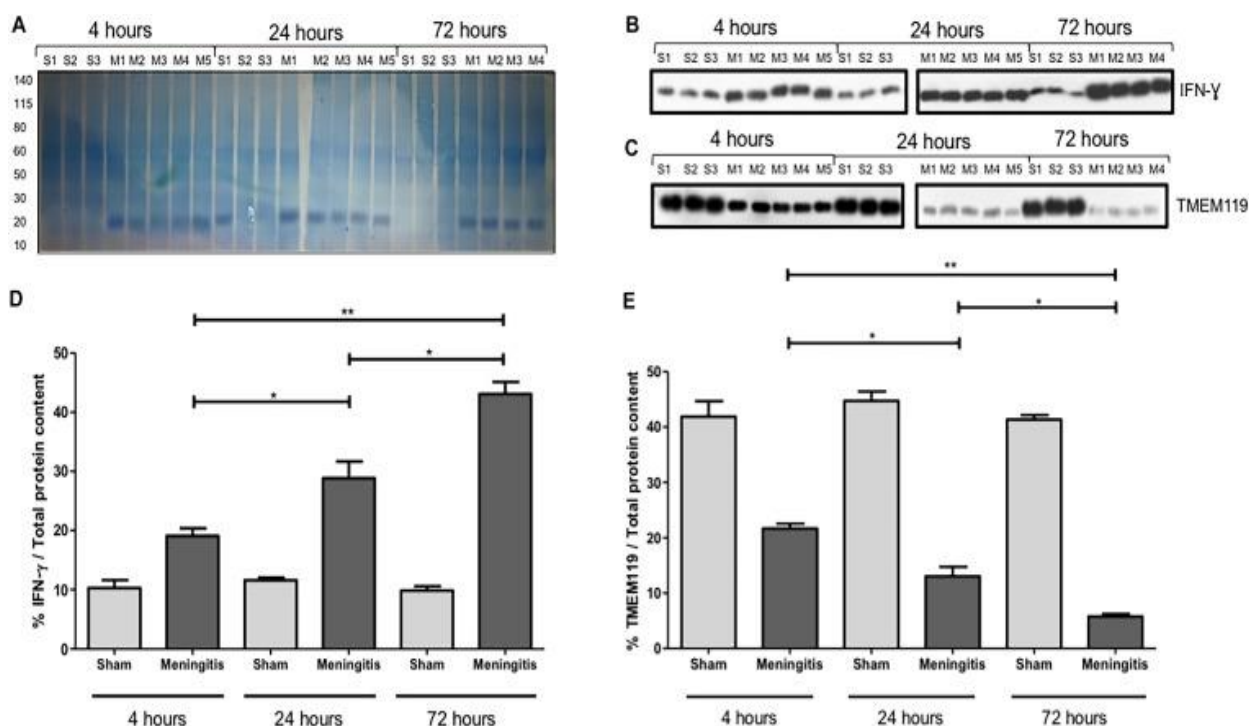
Como consequência do acúmulo de bactérias e componentes bacterianos no LCR, foi verificado o estado neuroinflamatório no cérebro dos animais. Na análise dos níveis de IBA-1, marcador de micróglia, 5 animais de cada grupo experimental foram avaliados. Houve aumento significativo nos cérebros dos ratos em 24 e 72 h dos animais meningite quando comparados com os animais com 4 horas após a infecção (figura 13,  $p < 0,01$ ).



**Figura 13:** Avaliação de IBA-1 durante a infecção pneumocócica com mau funcionamento do sistema glinfático. (A) Detecção de IBA-1 em amostras de cérebro de ratos de grupos de controle e meningite pela técnica de *Western blotting* (B) A porcentagem de IBA-1/teor de proteína total foi calculada usando *ImageJ*, e os dados são mostrados como média e desvio padrão. \*\* $p < 0,01$ ; n.s., não significativo. Os números de 1 a 5 referem-se ao número de ratos no grupo (controle ou meningite). O teor total de proteína foi medido após a coloração de Coomassie. Figura elaborada pela autora, 2025.

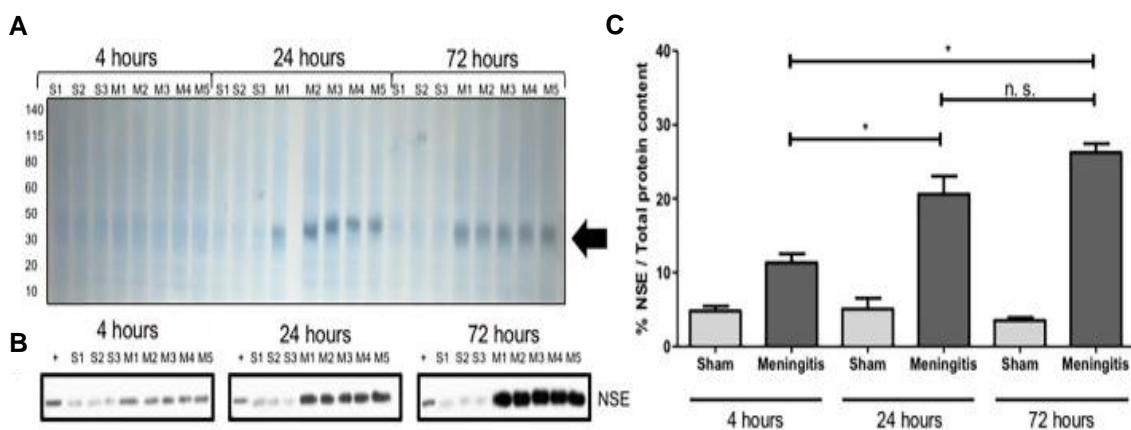
Para confirmar ainda mais o processo inflamatório durante a meningite pneumocócica com a funcionalidade prejudicada do sistema glinfático, foram medidos os níveis de IFN- $\gamma$  e TMEM119, 5 animais para cada grupo experimental, através da análise de *Western blotting*. Os resultados demonstram um aumento significativo de IFN- $\gamma$  nos homogeneizados cerebrais de 4, 24 e 72 horas dos

animais meningite (figura 14 A e B). Em contrapartida, foi observada uma diminuição consistente da expressão de TMEM119 em homogeneizados cerebrais de todos os tempos do grupo meningite (figura A e C). Na análise de quantificação das intensidades da banda proteica confirmou-se o aumento significativo do IFN- $\gamma$  (figura 14 D) e a diminuição significativa da TMEM119 (figura 14 E).



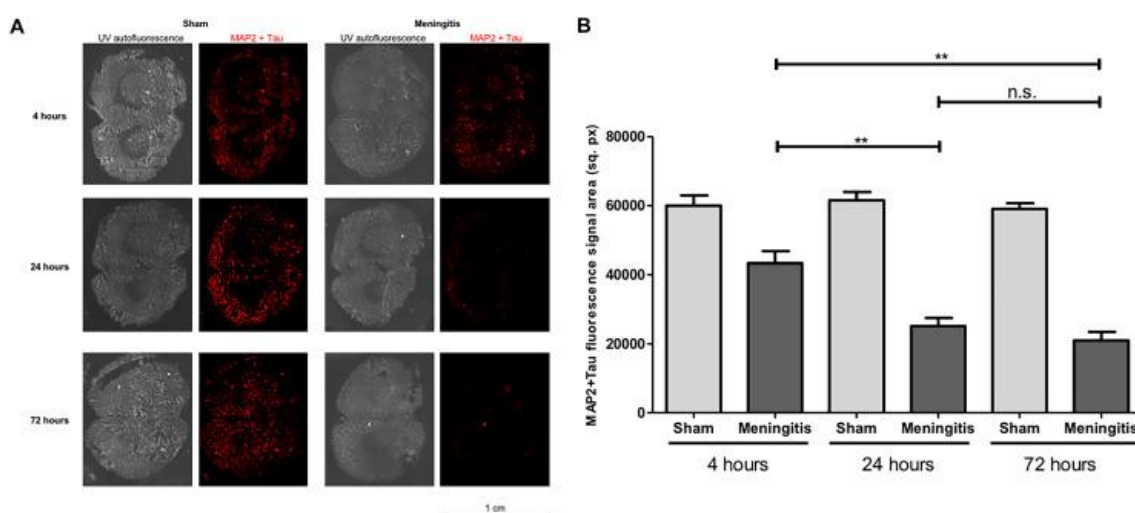
**Figura 14:** Aumento da neuroinflamação durante a infecção pneumocócica com um sistema glinfático prejudicado. O conteúdo total de proteína das amostras cerebral foi medido após a coloração de Coomassie. S (controle) e M (meningite). Os números de 1 a 5 referem-se ao número de ratos no grupo (controle ou meningite) em cada tempo. Detecção de *Western blotting* de IFN- $\gamma$  (B) e TMEM119 (C) foi realizada usando amostras homogeneizadas de cérebro de ratos de grupos controle e meningite. Porcentagens de IFN- $\gamma$ /teor de proteína total (D) e TMEM119/teor de proteína total (E) foram calculadas usando o ImageJ. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n.s., não significativo. Figura elaborada pela autora, 2025.

Outro parâmetro investigado foi o grau de dano neuronal. A expressão de NSE foi analisada no soro dos animais controle e meningite, sendo 5 animais para cada grupo experimental. Foi verificado um aumento significativo na expressão de NSE no soro do grupo meningite em 4, 24 e 72 horas (Figura 15 A a C), indicando que o aumento do dano neuronal ocorreu em paralelo com o aumento da neuroinflamação devido ao funcionamento prejudicado do sistema glinfático durante a meningite pneumocócica.



**Figura 15:** Expressão de NSE no soro de ratos após modelo experimental de meningite pneumocócica. O conteúdo total de proteína das amostras de homogeneizado cerebral foi medido após a coloração de Coomassie. S (controle) e M (meningite). Os números de 1 a 5 referem-se ao número de ratos no grupo (controle ou meningite) em cada tempo. (A) A seta preta aponta para uma intensidade aumentada da coloração de Coomassie em torno do peso molecular da NSE (cerca de 40 kDa), que é particularmente evidente para o grupo de meningite em 24 e 72 h. (B) As mesmas amostras foram usadas para análise de Western blotting para a detecção de NSE. (C) A porcentagem de NSE/conteúdo de proteína total foi calculada usando ImageJ, e os dados são mostrados como média e desvio padrão. \* $p < 0,05$ ; n.s., não significativo. Figura elaborada pela autora, 2025.

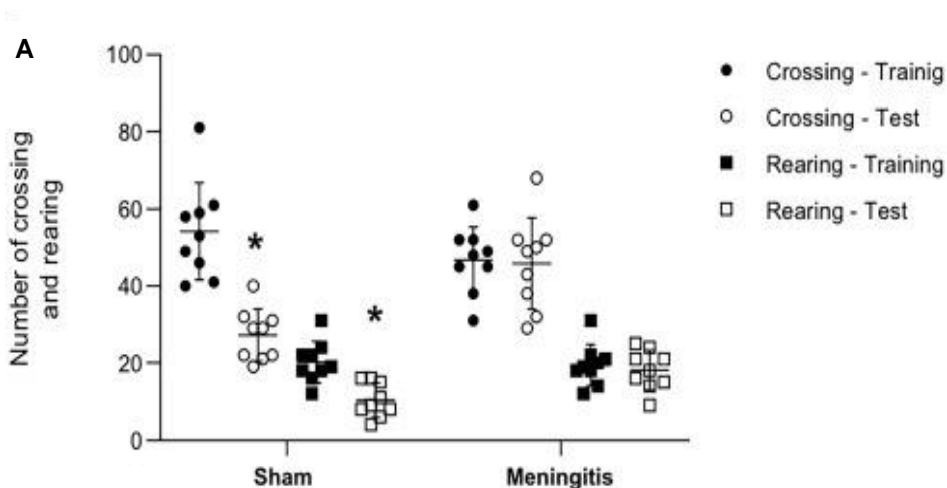
A fim de avaliar a quantidade de conexões sinápticas neuronais foram analisados os níveis de MAP2 e proteína Tau, 5 animais para cada grupo experimental, através de microscopia de imunofluorescência usando seções de tecido cerebral coradas. As seções de tecido cerebral de ratos submetidos à meningite pneumocócica mostraram uma diminuição significativa dos sinais fluorescentes de MAP2 e Tau ao longo do tempo, indicando uma redução das conexões sinápticas neuronais devido ao dano neuronal (figura 16A e B).



**Figura 16:** Perda de conexões sinápticas neuronais e consequente comprometimento das funções neurológicas durante a meningite pneumocócica com mau funcionamento do sistema glinfático. (A) As seções de tecido cerebral foram coradas para uma combinação de proteínas MAP2 e Tau (vermelho) e foram fotografadas com autofluorescência sob luz ultravioleta. Uma imagem representativa é mostrada por grupo (controle ou meningite) em cada tempo. (B) Quantificação do

sinal de fluorescência de MAP2 + Tau corado. Os dados são apresentados como média e desvio padrão. \*\* $p < 0,01$ ; n.s., não significativo. Figura elaborada pela autora, 2025.

Para investigar mais detalhadamente o dano às células neuronais causado pela meningite pneumocócica com funcionalidade do sistema glinfático prejudicada, foi realizado o teste comportamental de campo aberto, 10 animais para cada grupo experimental. No grupo controle foi verificada diferenças significativas entre as sessões treino e teste, onde houve diminuição do número de cruzamentos e levantamentos, demonstrando retenção de memória. Por outro lado, no grupo meningite, não foi observada diferença entre as sessões de treino e teste, indicando um comprometimento consistente da memória de habituação neste grupo (figura 17).



**Figura 17:** Dados da tarefa de campo aberto 10 dias após a indução da meningite pneumocócica. Os dados foram relatados como média e erro padrão dos valores médios e analisados por testes *t* de Student pareados ( $n = 9$  animais por grupo). \* $p < 0,05$  versus sessão treino. Figura elaborada pela autora, 2025.

## 5. DISCUSSÃO

A BHE que protege o SNC permite a passagem de moléculas importantes para a manutenção da vida como oxigênio (O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e glicose necessárias para satisfazer a demanda do metabolismo das células cerebrais e viabilizar processos celulares, além disso impede a entrada desregulada de proteínas e fluidos no cérebro (Hladky, Barrand 2016). Mesmo com essa camada protetora o espaço intersticial do cérebro ainda recebe resíduos solúveis devido ao seu metabolismo elevado (Raper et al., 2016). Com isso, o sistema glinfático demonstra-se como um valioso aliado para a manutenção do equilíbrio cerebral, apoiando a entrega de solutos e fluidos intersticiais, incluindo células imunes e macromoléculas, do cérebro para as rotas de saída do LCR e drenagem nos gânglios linfáticos (Reeves et al., 2020).

Em relação à integridade da BHE durante a meningite pneumocócica, relatos prévios com modelos animais de meningite derivado de bacteremia demonstraram que o tráfego de *S. pneumoniae*, disseminado para o LCR pelo sangue através da BHE, não causa interrupção significativa do endotélio vascular da BHE cujas junções apertadas endoteliais VE-caderina não estiveram comprometidas durante a transmigração de bactérias através do endotélio da BHE (Iovino et al., 2013, Iovino et al., 2017). Por outro lado, a infiltração de células imunes periféricas no cérebro pode alterar a integridade endotelial da BHE (Mook-Kanamori et al., 2011). A diapedese leucocitária requer mecanismos precisos de ligação de moléculas de adesão, selectinas e integrinas, que promovem a infiltração de leucócitos do sangue para o cérebro sem interromper o endotélio BHE (Wilson et al., 2010).

Neste estudo a função glinfática foi avaliada em um modelo animal de meningite pneumocócica em diferentes tempos após a administração do corante EBA. O grupo meningite apresentou acúmulo de EBA no cérebro em comparação com o grupo controle, demonstrando que a função glinfática foi afetada pela meningite. Para confirmar esse resultado, também foram avaliados os níveis de EBA na corrente sanguínea dos animais. O grupo controle apresentou um aumento nos níveis séricos de EBA em comparação com o grupo meningite, demonstrando que o grupo meningite foi incapaz de drenar o EBA do LCR para a corrente sanguínea, através dos gânglios linfáticos. Corroborando com estes resultados, um estudo

recente demonstrou que o influxo de LCR para o parênquima cerebral, bem como a drenagem de LCR para os linfonodos cervicais, foi significativamente reduzido no modelo de meningite por *S pneumoniae* em ratos, sugerindo que as armadilhas extracelulares de neutrófilos e a disfunção do sistema glinfático podem influenciar no edema cerebral (Pavan et al., 2021). Devido à perda de drenagem de solutos entre o LCR e o parênquima cerebral, a maioria dos componentes pneumocócicos pode permanecer acumulada nos compartimentos do LCR do cérebro. Notavelmente, uma consequência direta de um mau funcionamento do sistema glinfático é, de fato, o edema cerebral, que é o acúmulo de líquido no cérebro (Zhou et al., 2021).

A disfunção glinfática é caracterizada por uma troca reduzida entre o LCR e ISF, levando a um acúmulo de resíduos. Muitas doenças têm sido associadas à disfunção do sistema glinfático, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (Boland et al., 2018, Rasmussen et al., 2018, Verheggen et al., 2018). O transporte de BHE e as depurações glinfáticas são mecanismos interdependentes, e a disfunção desses mecanismos pode dificultar a depuração do soluto (Verheggen et al., 2018). A permeabilidade ou interrupção da BHE facilita a migração de células imunes periféricas e mediadores inflamatórios para o LCR, aumentando a produção de citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e moléculas neurotóxicas que contribuem para a ativação das células gliais e consequente neuroinflamação (Thorsdottir et al., 2019, Kadry et al., 2020). Estudos pré-clínicos de meningite bacteriana demonstraram que a quebra da BHE está associada ao comprometimento cognitivo (Barichello et al., 2012, Giridharan et al., 2020) e, quando enzimas proteolíticas como metaloproteínases de matriz foram bloqueadas, a disfunção cognitiva pode ser evitada (Barichello et al., 2013, Barichello et al., 2014).

Após a observação da retenção de EBA no cérebro e a sua disfunção de drenagem no soro no grupo de meningite, foi investigada a interação entre os astrócitos e a BHE. Essa análise astrocitária foi mediada pela avaliação dos níveis de canais de água AQP4, abundantemente expressa nas extremidades dos astrócitos em torno de pequenos vasos, atuante como um canal seletivo de água (Nielsen et al., 1997, Iliff et al., 2012). Esses canais AQP4 são componentes fundamentais do sistema glinfático, facilitando o transporte de solutos do espaço subaracnóideo perivascular e do parênquima cerebral (Mestre et al., 2018, Harrison et al., 2020, Silva et al., 2021). A expressão aumentada de AQP4 foi descrita

anteriormente em situações de neuroinflamação, presente em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Valenza et al., 2019), esclerose múltipla (Fukuda, Badaut 2012) e encefalopatia associada à sepse (Zhu et al., 2023). Em um estudo que avaliou a expressão de AQP4 no hipocampo e a terapia com dexametasona 24 horas após indução de modelo de meningite pneumocócica, verificou-se um aumento da expressão de AQP4 no grupo meningite e meningite associado a ceftriaxona, e diminuição nos animais tratados com antimicrobiano associado a dexametasona, indicando que o tratamento associado poderia reduzir o edema cerebral ao diminuir a expressão de AQP-4 (Du et al., 2015). Outro estudo com o mesmo modelo animal identificou que 30 horas após a infusão bacteriana houve um aumento de cerca de 7 vezes na expressão da proteína AQP4 no cérebro, o que aumentou ainda mais a permeabilidade à água da BHE e, portanto, o acúmulo de excesso de água cerebral (Papadopoulos, Verkman 2005). Por outro lado, Pavan e colaboradores observaram recentemente que, após a neuroinflamação causada por uma infecção pneumocócica no SNC, os níveis de expressão de AQP4 não são significativamente alterados em comparação com aqueles em uma situação não infectada. Os resultados do presente estudo se alinham com os de Pavan e colaboradores (Pavan et al., 2021), não sendo observado aumento dos níveis de expressão de AQP4 nos cérebros dos ratos afetados por meningite em comparação com os cérebros dos animais controle.

No presente estudo, um dos fatores que afetou significativamente o transporte de solutos do sistema glinfático durante a meningite pneumocócica não foi a expressão alterada de AQP4, mas sim a interrupção dos canais de água de AQP4 devido a um descolamento dos pés astrocíticos de sua co-localização com o endotélio de BHE. Os astrócitos são um componente fundamental do suporte para a BHE, com os pés astrocíticos em contato próximo com o endotélio vascular da BHE (Abbott et al., 2006). O encurtamento dos processos celulares astrocíticos causa o descolamento dos pés astrocíticos do endotélio vascular da BHE com consequente diminuição da função dos canais de água AQP4, sendo vistos em modelos animais de encefalomielite autoimune experimental (Wolburg-Buchholz et al., 2009), e DP (Si et al., 2024). Esse processo celular é uma consequência direta das mudanças morfológicas dos astrócitos que, durante a neuroinflamação, sofrem astrogliose, na qual o corpo celular se torna mais redondo e proeminente, e os processos celulares se tornam mais espessos e curtos (Pekny, Nilsson 2005, Zhang et al., 2010). Essa

perda de localização polarizada de AQP4 causa a redistribuição de água em toda a BHE, alterando sua função de filtração e propiciando a formação de edema (Wolburg-Buchholz et al., 2009).

A fim de avaliar a presença da bactéria no LCR e parênquima cerebral dos animais, foi avaliada a expressão de Ply e a cápsula polissacarídica de sorotipo 3 nos animais. Ambas as proteínas se demonstraram aumentados no LCR dos animais meningite em 4, 24 e 72 horas; entretanto, não houve diferença significativa dos seus níveis nas amostras cerebrais. A Ply desempenha um papel fundamental na patogênese da meningite pneumocócica, facilitando a travessia bacteriana pela BHE (Nishimoto et al., 2020). Concentrações elevadas de Ply no LCR em modelos animais e em humanos foram descritas na literatura (Spreer et al., 2003). Um estudo clínico com pacientes internados devido à meningite bacteriana identificou que os níveis de Ply foram significativamente reduzidos entre a admissão e 48 horas nos pacientes sobreviventes. Entretanto, os pacientes não sobreviventes apresentaram níveis mais altos de Ply, da admissão até o óbito, e apesar da queda no número de bactérias, essa proteína está envolvida na patogênese grave (Wall et al., 2012).

Para validar o estado neuroinflamatório no cérebro dos animais foi verificada a expressão de IBA-1, IFN- $\gamma$  e TMEM119. Na avaliação dos níveis de IBA-1 houve aumento significativamente desse marcador em 24 e 72 horas no cérebro dos animais meningite quando comparados aos animais 4 horas após a infecção. Corroborando com estes resultados, um estudo recente verificou que a expressão microglial aumentada, detectada IBA-1, foi observada 24 horas após a indução da meningite pneumocócica, e permaneceu elevada após 10 dias da infecção, e o uso do inibidor MCC950 diminuiu a expressão de IBA-1 no grupo meningite em comparação com o grupo controle dez dias após a indução (Generoso et al., 2024). Resultados semelhantes foram observados ao obter imagens do cerebrais de córtex pré-frontal e do hipocampo por tomografia por emissão de pósitrons (PET) após a indução da doença, em 24 horas e dez dias, sugerindo aumento da ativação microglial, demonstrando a presença de neuroinflamação crônica, que pode ser prejudicial e promotora de comprometimento cognitivo a longo prazo (Giridharan et al., 2020). Sabe-se que em situações de insulto ao SNC, como doenças autoimunes ou processos infecciosos, a micróglia é rapidamente ativada, resultando em sua migração para o local da lesão, com consequente proliferação e alteração de sua

morfologia para formato ameboide, exibindo, dessa forma, maior imunorreatividade ao IBA-1 e outros marcadores intracelulares (Greter et al., 2015).

Os resultados deste estudo também demonstraram um aumento significativo de IFN- $\gamma$  nos homogeneizados cerebrais dos animais meningite em todos os tempos analisado, 4, 24 e 72 horas. Níveis aumentados da citocina INF- $\gamma$ , demonstraram exercer um papel crítico na potencialização da sinalização pró-inflamatória ao preparar macrófagos e micróglia durante infecções (Kulkarni et al., 2016, Kopitar-Jerala 2017). Resultados semelhantes foram observados em um estudo com modelo experimental de meningite, onde os níveis de IFN- $\gamma$  apresentaram um aumento significativo em 24 horas no LCR e o uso de uma proteína de choque térmico alfa B-cristalina (HspB5) inibiu essa elevação (Erni et al., 2019). Too e colaboradores também demonstraram que em 20 e 44 horas após a indução de modelo experimental de meningite, houve aumento significativo de IFN- $\gamma$  no LCR dos animais. Todavia, camundongos IFN- $\gamma$  (-/-) mostraram uma resposta inflamatória diminuída (níveis atenuados de citocinas pró-inflamatórias no LCR) e patologias cerebrais mais leves (menos permeabilidade da BHE e hemorragia cerebral) durante a fase aguda da doença (Too et al., 2014).

Já na avaliação da expressão de TMEM119, marcador específico da micróglia, o presente estudo encontrou níveis significativamente diminuídos no grupo meningite, nos mesmos tempos avaliados, quando comparados ao controle. O TMEM119 é o primeiro marcador descoberto expresso exclusivamente pela micróglia em estados saudáveis e doentes, tanto em camundongos quanto em humanos (Bennett et al., 2016). Similarmente aos resultados encontrados, recentemente foi descrito que a TMEM119 é regulada negativamente na micróglia durante a neuroinflamação (Liu et al., 2021) e doenças cerebrais, incluindo doenças de Alzheimer (Sobue et al., 2021), e esclerose múltipla (van Wageningen et al., 2019).

Este estudo também avaliou o dano neuronal e conexões sinápticas após a indução do modelo animal de meningite pneumocócica. Foi encontrado um aumento significativo nos níveis de expressão de NSE no soro dos animais meningite em 4, 24 e 72 horas, quando comparado ao controle. O NSE é liberado de neurônios danificados e sua detecção sanguínea é frequentemente realizada em um ambiente clínico para avaliar quantitativamente o dano neuronal durante lesões cerebrais (Janigro et al., 2020), sendo visto sua exacerbação em casos de

neuroblastoma em recém-nascidos, bem como diferentes tipos de cânceres (Isgrò et al., 2015), encefalite (Czupryna et al., 2018) e meningite bacteriana (Grønhøj et al., 2021). Já os níveis de MAP2 e proteína Tau, respectivamente expressas principalmente em dendritos neuronais e axônios (Caceres et al., 1984, Iwata et al., 2019), demonstraram uma diminuição significativa de sua expressão no soro dos animais do grupo meningite quando comparado ao controle em todos os tempos analisados, correlacionando-se a uma redução das conexões sinápticas neuronais. A lesão neuronal é frequentemente observada após a neuroinflamação e os danos aos neurônios podem ser causados tanto pela interação direta das bactérias ou componentes bacterianos, como a pneumolisina, com os neurônios (Tabusi et al., 2021) quanto pelo efeito prejudicial dos compostos pró-inflamatórios liberados durante o processo de neuroinflamação (Nau, Brück 2002).

Associado à perda da funcionalidade do sistema glinfático durante a patogênese da meningite pneumocócica, este estudo mostrou que a neuroinflamação e a lesão neuronal aumentam com o tempo durante a infecção. Para comprovar essa hipótese foi utilizado o teste comportamental de campo aberto e verificado que o grupo meningite apresentou comprometimento da memória de habituação, diferentemente do observado no grupo controle que apresentou retenção de memória. Sendo assim, estes dados sugerem fortemente que a disfunção do sistema glinfático pode ser outro fator associado ao comprometimento cognitivo de longo prazo em sobreviventes de meningite. Corroborando com estes resultados um estudo com o mesmo modelo animal verificou que os animais, após 10 dias da inoculação bacteriana e livres de infecção, apresentaram comprometimento da memória de habituação e reconhecimento de novos objetos, e o tratamento do com o inibidor MCC950 reverteu o dano cognitivo induzido pela meningite pneumocócica (Generoso et al., 2024).

Os sobreviventes de meningite bacteriana apresentam um risco aumentado de desencadear comprometimento neurocognitivo. Em uma coorte realizada na Inglaterra com crianças expostas a meningite nos 18 primeiros meses de vida e acompanhadas dos 9 aos 13 anos de vida, foi associada a dificuldades neurocognitivas, educacionais e psicológicas durante a infância e o início da adolescência (Khandaker et al., 2015). Outro estudo também demonstrou que a meningite durante a infância aumenta o risco de esquizofrenia na idade adulta (Abraham et al., 2005). Em adultos, as sequelas neurológicas da meningite

pneumocócica em países com altos recursos apresentaram taxas de 32% de comprometimento cognitivo, 4% de hidrocefalia, 31% de convulsões, 22 a 69% de perda auditiva e 11 a 36% de déficits focais (Lucas et al., 2016). As conexões entre a quibera da BHE, a disfunção glinfática e o comprometimento cognitivo em sobreviventes de meningite podem ser um novo caminho para investigar mecanismos para prevenir esses eventos e restabelecer a função diária de pacientes que ainda sofrem de disfunção após meningite bacteriana.

## 6. CONCLUSÃO

A meningite pneumocócica experimental esteve relacionada à perda da funcionalidade do sistema glinfático com consequente acúmulo de componentes pneumocócicos, como a citotoxina Ply e a cápsula polissacarídica, utilizadas como marcadores para a presença de *S. pneumoniae* no espaço subaracnóideo perivascular ocupado pelo LCR.

Esse acúmulo de bactérias leva a um aumento expressivo da neuroinflamação e lesão neuronal. Portanto, a perda da funcionalidade do sistema glinfático pode desempenhar um papel crucial na determinação das sequelas neurológicas que acometem os sobreviventes. Além disso, danos neuronais graves e funções neurológicas prejudicadas possuem uma correlação positiva quando o sistema glinfático está disfuncional na meningite pneumocócica.

Neste estudo, foi relatado pela primeira vez que o comprometimento do transporte de solutos entre o espaço subaracnóideo perivascular e o parênquima cerebral ocorre devido ao descolamento dos pés astrocíticos da BHE, com provável perda da função fisiológica dos canais de água AQP4 de transporte de soluto dentro do sistema glinfático.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, N. J., *et al.* "Structure and function of the blood-brain barrier." **Neurobiol Dis** 37(1): 13-25. 2010.
- Abbott, N. J.;L. Rönnbäck and E. Hansson. "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." **Nat Rev Neurosci** 7(1): 41-53. 2006.
- Abraham, A. L.;R. Focaccia and W. F. Gattaz. "Childhood meningitis increases the risk for adult schizophrenia." **World J Biol Psychiatry** 6 Suppl 2: 44-48. 2005.
- Acevedo, R., *et al.* "The Global Meningococcal Initiative meeting on prevention of meningococcal disease worldwide: Epidemiology, surveillance, hypervirulent strains, antibiotic resistance and high-risk populations." **Expert Rev Vaccines** 18(1): 15-30. 2019.
- Afridi, R.;M. H. Rahman and K. Suk. "Implications of glial metabolic dysregulation in the pathophysiology of neurodegenerative diseases." **Neurobiology of Disease** 174: 105874. 2022.
- Archibald, L. K. and R. G. Quisling. "Central Nervous System Infections." **Textbook of Neurointensive Care**: 427-517. 2013.
- Barichello, T., *et al.* "Targets for adjunctive therapy in pneumococcal meningitis." **J Neuroimmunol** 278: 262-270. 2015.
- Barichello, T., *et al.* "The blood-brain barrier dysfunction in sepsis." **Tissue Barriers** 9(1): 1840912. 2021.
- Barichello, T., *et al.* "Inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9 prevents cognitive impairment induced by pneumococcal meningitis in Wistar rats." **Exp Biol Med (Maywood)** 239(2): 225-231. 2014.
- Barichello, T., *et al.* "Circulating concentrations, cerebral output of the CINC-1 and blood-brain barrier disruption in Wistar rats after pneumococcal meningitis induction." **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 31(8): 2005-2009. 2012.
- Barichello, T., *et al.* "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase prevented cognitive impairment in adult Wistar rats subjected to pneumococcal meningitis." **Transl Res** 162(6): 390-397. 2013.
- Barichello, T., *et al.* "Evaluation of the brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and memory in adult rats survivors of the neonatal meningitis by *Streptococcus agalactiae*." **Brain Research Bulletin** 92: 56-59. 2013.

- Barichello, T., *et al.* "Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*." **Neurochem Res** 36(10): 1922-1930. 2011.
- Barichello, T., *et al.* "Depression-Like Adult Behaviors may be a Long-Term Result of Experimental Pneumococcal Meningitis in Wistar Rats Infants." **Neurochem Res** 41(10): 2771-2778. 2016.
- Bennett, M. L., *et al.* "New tools for studying microglia in the mouse and human CNS." **Proc Natl Acad Sci U S A** 113(12): E1738-1746. 2016.
- Bijlsma, M. W., *et al.* "Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort study." **Lancet Infect Dis** 16(3): 339-347. 2016.
- Boland, B., *et al.* "Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing." **Nat Rev Drug Discov** 17(9): 660-688. 2018.
- Caceres, A., *et al.* "MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture." **Brain Res** 315(2): 314-318. 1984.
- Costerus, J. M., *et al.* "Community-acquired bacterial meningitis." **Curr Opin Infect Dis** 30(1): 135-141. 2017.
- Cserr, H. F. "Relationship between cerebrospinal fluid and interstitial fluid of brain." **Fed Proc** 33(9): 2075-2078. 1974.
- Czupryna, P., *et al.* "Evaluation of NSE and S100B in patients with tick-borne encephalitis." **Brain Behav** 8(12): e01160. 2018.
- Daneman, R. "The blood-brain barrier in health and disease." **Ann Neurol** 72(5): 648-672. 2012.
- Du, K. X., *et al.* "Effects of dexamethasone on aquaporin-4 expression in brain tissue of rat with bacterial meningitis." **Int J Clin Exp Pathol** 8(3): 3090-3096. 2015.
- Engelen-Lee, J. Y., *et al.* "Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path)." **Acta Neuropathol Commun** 4: 26. 2016.
- Engholm, D. H., *et al.* "A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*." **FEMS Microbiol Rev** 41(6): 854-879. 2017.
- Erni, S. T., *et al.* "Anti-inflammatory and Oto-Protective Effect of the Small Heat Shock Protein Alpha B-Crystallin (HspB5) in Experimental Pneumococcal Meningitis." **Front Neurol** 10: 570. 2019.

- Fitzgerald, D. and G. W. Waterer. "Invasive Pneumococcal and Meningococcal Disease." **Infect Dis Clin North Am** 33(4): 1125-1141. 2019.
- Fuentes-Antrás, J., *et al.* "Acute Community-Acquired Bacterial Meningitis: Update on Clinical Presentation and Prognostic factors." **New Microbiol** 41(4): 81-87. 2019.
- Fukuda, A. M. and J. Badaut. "Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation." **J Neuroinflammation** 9: 279. 2012.
- Generoso, J. S., *et al.* "NLRP3 Activation Contributes to Memory Impairment in an Experimental Model of Pneumococcal Meningitis." **Mol Neurobiol** 61(1): 239-251. 2024.
- Generoso, J. S., *et al.* "Dysfunctional Glymphatic System with Disrupted Aquaporin 4 Expression Pattern on Astrocytes Causes Bacterial Product Accumulation in the CSF during Pneumococcal Meningitis." **mBio** 13(5): e0188622. 2022.
- Gil, E., *et al.* "Streptococcus pneumoniae meningitis and the CNS barriers." **Front Cell Infect Microbiol** 12: 1106596. 2022.
- Giridharan, V. V., *et al.* "Neuroinflammation trajectories precede cognitive impairment after experimental meningitis-evidence from an in vivo PET study." **J Neuroinflammation** 17(1): 5. 2020.
- Greter, M.;I. Lelios and A. L. Croxford. "Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation." **Front Immunol** 6: 249. 2015.
- Grønhoj, M. H., *et al.* "Serum levels of neurofilament light chain, neuron-specific enolase and S100 calcium-binding protein B during acute bacterial meningitis: a prospective cohort study." **Infect Dis (Lond)** 53(6): 409-419. 2021.
- Harrison, I. F., *et al.* "Impaired glymphatic function and clearance of tau in an Alzheimer's disease model." **Brain** 143(8): 2576-2593. 2020.
- Hasbun, R. "Update and advances in community acquired bacterial meningitis." **Curr Opin Infect Dis** 32(3): 233-238. 2019.
- Hasperhoven, G. F., *et al.* "Universal screening versus risk-based protocols for antibiotic prophylaxis during childbirth to prevent early-onset group B streptococcal disease: a systematic review and meta-analysis." **Bjog** 127(6): 680-691. 2020.
- Heckenberg, S. G.;M. C. Brouwer and D. van de Beek. "Bacterial meningitis." **Handb Clin Neurol** 121: 1361-1375. 2014.
- Henriques-Normark, B. and E. I. Tuomanen. "The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis." **Cold Spring Harb Perspect Med** 3(7). 2013.

- Hladky, S. B. and M. A. Barrand. "Fluid and ion transfer across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles." **Fluids Barriers CNS** 13(1): 19. 2016.
- Iliff, J. J., *et al.* "Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI." **J Clin Invest** 123(3): 1299-1309. 2013.
- Iliff, J. J., *et al.* "A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ ." **Sci Transl Med** 4(147): 147ra111. 2012.
- Iovino, F., *et al.* "pIgR and PECAM-1 bind to pneumococcal adhesins RrgA and PspC mediating bacterial brain invasion." **J Exp Med** 214(6): 1619-1630. 2017.
- Iovino, F., *et al.* "Pneumococcal meningitis is promoted by single cocci expressing pilus adhesin RrgA." **The Journal of Clinical Investigation** 126(8): 2821-2826. 2016.
- Iovino, F., *et al.* "Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis." **PLoS One** 8(7): e68408. 2013.
- Isgrò, M. A.;P. Bottoni and R. Scatena. "Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects." **Adv Exp Med Biol** 867: 125-143. 2015.
- Iwata, M., *et al.* "Regulatory mechanisms for the axonal localization of tau protein in neurons." **Mol Biol Cell** 30(19): 2441-2457. 2019.
- Janigro, D., *et al.* "Peripheral Blood and Salivary Biomarkers of Blood-Brain Barrier Permeability and Neuronal Damage: Clinical and Applied Concepts." **Front Neurol** 11: 577312. 2020.
- Jessen, K. R.;R. Mirsky and A. C. Lloyd. "Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair." **Cold Spring Harb Perspect Biol** 7(7): a020487. 2015.
- Jessen, N. A., *et al.* "The Glymphatic System: A Beginner's Guide." **Neurochem Res** 40(12): 2583-2599. 2015.
- Johanson, C. E., *et al.* "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease." **Cerebrospinal Fluid Res** 5: 10. 2008.
- Kadry, H.;B. Noorani and L. Cucullo. "A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity." **Fluids Barriers CNS** 17(1): 69. 2020.
- Khandaker, G. M., *et al.* "A population-based prospective birth cohort study of childhood neurocognitive and psychological functioning in healthy survivors of early life meningitis." **Ann Epidemiol** 25(4): 236-242. 2015.

- Kopitar-Jerala, N. "The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation." **Front Immunol** 8: 873. 2017.
- Kress, B. T., *et al.* "Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain." **Ann Neurol** 76(6): 845-861. 2014.
- Kulkarni, A.;P. Ganesan and L. A. O'Donnell. "Interferon Gamma: Influence on Neural Stem Cell Function in Neurodegenerative and Neuroinflammatory Disease." **Clin Med Insights Pathol** 9(Suppl 1): 9-19. 2016.
- Larsen, J. M.;D. R. Martin and M. E. Byrne. "Recent advances in delivery through the blood-brain barrier." **Curr Top Med Chem** 14(9): 1148-1160. 2014.
- Leib, S. L. and M. G. Täuber. "Pathogenesis of bacterial meningitis." **Infect Dis Clin North Am** 13(3): 527-548, v-vi. 1999.
- Liechti, F. D.;D. Grandgirard and S. L. Leib. "Bacterial meningitis: insights into pathogenesis and evaluation of new treatment options: a perspective from experimental studies." **Future Microbiol** 10(7): 1195-1213. 2015.
- Liu, H., *et al.* "Pro-inflammatory and proliferative microglia drive progression of glioblastoma." **Cell Rep** 36(11): 109718. 2021.
- Loughran, A. J.;C. J. Orihuela and E. I. Tuomanen. "Streptococcus pneumoniae: Invasion and Inflammation." **Microbiol Spectr** 7(2). 2019.
- Louveau, A., *et al.* "CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature." **Nat Neurosci** 21(10): 1380-1391. 2018.
- Louveau, A., *et al.* "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels." **Nature** 523(7560): 337-341. 2015.
- Lucas, M. J.;M. C. Brouwer and D. van de Beek. "Neurological sequelae of bacterial meningitis." **J Infect** 73(1): 18-27. 2016.
- McCullers, J. A., *et al.* "Influenza enhances susceptibility to natural acquisition of and disease due to Streptococcus pneumoniae in ferrets." **J Infect Dis** 202(8): 1287-1295. 2010.
- Mestre, H., *et al.* "Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain." **Elife** 7. 2018.
- Mogensen, F. L.;C. Delle and M. Nedergaard. "The Glymphatic System (En)during Inflammation." **Int J Mol Sci** 22(14). 2021.
- Mook-Kanamori, B. B., *et al.* "Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis." **Clin Microbiol Rev** 24(3): 557-591. 2011.

- Nau, R. and W. Brück. "Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy." **Trends Neurosci** 25(1): 38-45. 2002.
- Nelson, A. L., *et al.* "Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance." **Infect Immun** 75(1): 83-90. 2007.
- Nielsen, S., *et al.* "Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain." **J Neurosci** 17(1): 171-180. 1997.
- Nishimoto, A. T.;J. W. Rosch and E. I. Tuomanen. "Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target." **Front Microbiol** 11: 1543. 2020.
- Numminen, E., *et al.* "Climate induces seasonality in pneumococcal transmission." **Sci Rep** 5: 11344. 2015.
- Oordt-Speets, A. M., *et al.* "Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis." **PLOS ONE** 13(6): e0198772. 2018.
- Organization, W. H. "Defeating meningitis by 2030: a global road map." **Defeating meningitis by 2030: a global road map** 2021.DOI.
- Papadopoulos, M. C. and A. S. Verkman. "Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis." **J Biol Chem** 280(14): 13906-13912. 2005.
- Parellada, C. I., *et al.* "Trends in Pneumococcal and Bacterial Meningitis in Brazil from 2007 to 2019." **Vaccines (Basel)** 11(8). 2023.
- Pavan, C., *et al.* "DNase Treatment Prevents Cerebrospinal Fluid Block in Early Experimental Pneumococcal Meningitis." **Ann Neurol** 90(4): 653-669. 2021.
- Pekny, M. and M. Nilsson. "Astrocyte activation and reactive gliosis." **Glia** 50(4): 427-434. 2005.
- Raper, D.;A. Louveau and J. Kipnis. "How Do Meningeal Lymphatic Vessels Drain the CNS?" **Trends Neurosci** 39(9): 581-586. 2016.
- Rasmussen, M. K.;H. Mestre and M. Nedergaard. "The glymphatic pathway in neurological disorders." **Lancet Neurol** 17(11): 1016-1024. 2018.
- Reeves, B. C., *et al.* "Glymphatic System Impairment in Alzheimer's Disease and Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus." **Trends Mol Med** 26(3): 285-295. 2020.
- Rivera, A., *et al.* "Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity." **Nat Immunol** 17(4): 356-363. 2016.
- Sellner, J.;M. G. Täuber and S. L. Leib. "Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections." **Handb Clin Neurol** 96: 1-16. 2010.

- Si, X., *et al.* "Matrix metalloproteinase-9 inhibition prevents aquaporin-4 depolarization-mediated glymphatic dysfunction in Parkinson's disease." **J Adv Res** 56: 125-136. 2024.
- Silva, A. F. T. d., *et al.* "Estudo epidemiológico sobre meningite bacteriana no Brasil no período entre 2009 a 2018." **Revista de Medicina** 100(3): 220-228. 2021.
- Silva, I., *et al.* "Glymphatic system, AQP4, and their implications in Alzheimer's disease." **Neurol Res Pract** 3(1): 5. 2021.
- Sobue, A., *et al.* "Microglial gene signature reveals loss of homeostatic microglia associated with neurodegeneration of Alzheimer's disease." **Acta Neuropathol Commun** 9(1): 1. 2021.
- Somand, D. and W. Meurer. "Central nervous system infections." **Emerg Med Clin North Am** 27(1): 89-100, ix. 2009.
- Spreer, A., *et al.* "Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone." **Antimicrob Agents Chemother** 47(8): 2649-2654. 2003.
- Subramanian, K.;B. Henriques-Normark and S. Normark. "Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen." **Cell Microbiol** 21(11): e13077. 2019.
- Swartz, M. A.;J. A. Hubbell and S. T. Reddy. "Lymphatic drainage function and its immunological implications: from dendritic cell homing to vaccine design." **Semin Immunol** 20(2): 147-156. 2008.
- Tabusi, M., *et al.* "Neuronal death in pneumococcal meningitis is triggered by pneumolysin and RrgA interactions with  $\beta$ -actin." **PLoS Pathog** 17(3): e1009432. 2021.
- Ter Horst, L., *et al.* "Recurrent Community-Acquired Bacterial Meningitis in Adults." **Clin Infect Dis** 73(9): e2545-e2551. 2021.
- Thorsdottir, S.;B. Henriques-Normark and F. Iovino. "The Role of Microglia in Bacterial Meningitis: Inflammatory Response, Experimental Models and New Neuroprotective Therapeutic Strategies." **Front Microbiol** 10: 576. 2019.
- Too, L. K., *et al.* "The pro-inflammatory cytokine interferon-gamma is an important driver of neuropathology and behavioural sequelae in experimental pneumococcal meningitis." **Brain Behav Immun** 40: 252-268. 2014.
- Valenza, M., *et al.* "Altered Waste Disposal System in Aging and Alzheimer's Disease: Focus on Astrocytic Aquaporin-4." **Front Pharmacol** 10: 1656. 2019.

- van Aalst, M., *et al.* "Incidence of invasive pneumococcal disease in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis." **Travel Med Infect Dis** 24: 89-100. 2018.
- van de Beek, D., *et al.* "Community-acquired bacterial meningitis." **Nat Rev Dis Primers** 2: 16074. 2016.
- van de Beek, D., *et al.* "Community-acquired bacterial meningitis." **Lancet** 398(10306): 1171-1183. 2021.
- van de Beek, D., *et al.* "ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis." **Clin Microbiol Infect** 22 Suppl 3: S37-62. 2016.
- van Wageningen, T. A., *et al.* "Regulation of microglial TMEM119 and P2RY12 immunoreactivity in multiple sclerosis white and grey matter lesions is dependent on their inflammatory environment." **Acta Neuropathol Commun** 7(1): 206. 2019.
- Verheggen, I. C. M., *et al.* "Interaction between blood-brain barrier and glymphatic system in solute clearance." **Neurosci Biobehav Rev** 90: 26-33. 2018.
- Vianna, M. R., *et al.* "Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat." **Learn Mem** 7(5): 333-340. 2000.
- Wall, E. C., *et al.* "Persistence of Pneumolysin in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Pneumococcal Meningitis Is Associated With Mortality." **Clinical Infectious Diseases** 54(5): 701-705. 2012.
- Weight, C. M., *et al.* "Microinvasion by *Streptococcus pneumoniae* induces epithelial innate immunity during colonisation at the human mucosal surface." **Nature Communications** 10(1): 3060. 2019.
- Weller, R. O., *et al.* "Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease." **Acta Neuropathol** 117(1): 1-14. 2009.
- Wilson, E. H.; W. Weninger and C. A. Hunter. "Trafficking of immune cells in the central nervous system." **J Clin Invest** 120(5): 1368-1379. 2010.
- Wolburg-Buchholz, K., *et al.* "Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis." **Acta Neuropathol** 118(2): 219-233. 2009.
- Zhang, D., *et al.* "Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia?" **Mol Neurobiol** 41(2-3): 232-241. 2010.

Zhou, X., *et al.* "Glymphatic System in the Central Nervous System, a Novel Therapeutic Direction Against Brain Edema After Stroke." **Front Aging Neurosci** 13: 698036. 2021.

Zhu, D. D., *et al.* "AQP4 Aggravates Cognitive Impairment in Sepsis-Associated Encephalopathy through Inhibiting Na(v) 1.6-Mediated Astrocyte Autophagy." **Adv Sci (Weinh)** 10(14): e2205862. 2023.

Zlokovic, B. V. "The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders." **Neuron** 57(2): 178-201. 2008.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



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



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **23/05/2023**.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação da funcionalidade do sistema glnfático e mecanismos de disfunção cognitiva em longo prazo em modelo experimental de meningite pneumocócica e em modelo de sepse.
<b>Project title</b>	Evaluation of the functionality of the glymphatic system and mechanisms of long-term cognitive dysfunction in an experimental model of pneumococcal meningitis or sepsis.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	73/2022 adendo
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	<b>Jaqueline da Silva Generoso</b>
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Igor Pereira Bilésimo, Cristiano Julio Faller, Beatriz Brandão Lima, Beatriz Ramos Maccari, Eliana Marcon Cadornin, Ingridy da Paz Bauer, Nicole Golombieski Duarte, Pedro Mendes Maciel, Jéssica Zilli Nunes, Isadora de Bittencourt Benedet, Julia Torcelli Noetzold, Diogo Domingui, Lucinéia Gainski Danielski, Tatiana Barichello, Fabricia Petronilho, Samuel Brasil Stonoga, João Víctor Vicente Costa, Eloa Melpomene Piva Uchida, Amanda Christine da Silva Kursancew, Josiane Budni, Eduarda Behenck Medeiros, Gabriel Casagrande Zobot, Adrielly Vargas, Bárbara Machado Naspolini Macarini, Laura Ceolin de Jesus, Murilo Saibert Tenfen, Amanda Boaventura, Paula Abatti Moretto, Helder Robson de Oliveira Chaves Junior, Jaqueline Cardozo, Luísa Rosler Grings, Anny Carolyny Corrêa Bonfante, Kamila Caroline Rocha Ferreira, Vinícius Rampineli Alberton, Lidia Kulckamp Alberton, Amanda Rodrigues Dicksen, Gustavo de Bem Silveira, Maitê Matté, Gabriela Piovesan Fenilli, Natalli Studnicka.
<b>Finalidade</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	03/11/2022 a 03/11/2023
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico / Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250 – 300g
<b>Número de animais</b>	Masculino 188
<b>Procedência</b>	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that 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 by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

*Josiane Budni*  
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 23 de maio de 2023