

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

GUSTAVO HENRIQUE FAVARETTO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES INTESTINAIS E DANO
COGNITIVO APÓS MENINGITE PNEUMOCÓCICA EXPERIMENTAL**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

GUSTAVO HENRIQUE FAVARETTO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES INTESTINAIS E DANO
COGNITIVO APÓS MENINGITE PNEUMOCÓCICA EXPERIMENTAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Jaqueline da Silva
Generoso

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F272a Favaretto, Gustavo Henrique.

Associação entre alterações intestinais e dano cognitivo após meningite pneumocócica experimental / Gustavo Henrique Favaretto. - 2024.

56 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Jaqueline da Silva Generoso.

1. Meningite pneumocócica - Complicações e sequelas. 2. Microbioma gastrointestinal - Inflamação. 3. Neuroinflamação. 4. Dano cognitivo. 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

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 442

Com início às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 26 (vinte e seis) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 101/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **GUSTAVO HENRIQUE FAVARETTO**, sob a orientação da **Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso**, intitulada “**ASSOCIAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES INTESTINAIS E DANO COGNITIVO APÓS MENINGITE PNEUMOCÓCICA EXPERIMENTAL**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Lucinéia Gainski Danielski (The University of Texas Health Science Center at Houston) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 26 (vinte e seis) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

O projeto foi elaborado seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por me abençoar com tantos presentes, me dando talvez além do que possa merecer.

À minha família, fonte de amor e apoio incondicionais, pela paciência e incentivo irrestrito, fundamentais durante toda esta caminhada.

Agradeço imensamente a professora Dra. Jaqueline da Silva Generoso, por sua orientação, conhecimento e inspiração. Pela condução e construção, me auxiliando no desenvolvimento deste trabalho da melhor forma.

Aos meus colegas do laboratório e aos colaboradores da universidade que contribuíram em cada etapa e tornaram possível a sua execução. Sem essa equipe não seria possível o término dessa dissertação.

Aos professores das disciplinas do mestrado que tornaram estes dois anos uma experiência rica em conteúdo e inspiração.

Às instituições de ensino UNESC e UNIFEBE por proporcionar subsídios e ótimas estruturas para estudos e pesquisas.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

A meningite pneumocócica é uma grave infecção do sistema nervoso central (SNC) com alto índice de mortalidade e de morbidade em todo o mundo. O *Streptococcus pneumoniae* tem diversos mecanismos de virulência que o permite invadir o SNC e, ao alcançar o líquido cefalorraquidiano (LCR), induzir uma robusta resposta imunológica no hospedeiro. A cascata inflamatória que se desencadeia aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica levando à pleocitose e inflamação. Apesar dos avanços terapêuticos, a meningite pneumocócica é associada a comprometimento neurológico persistente em grande parte dos sobreviventes. Sabe-se que infecções graves têm potencial de gerar disfunção no microbioma intestinal. Alterações da homeostase do eixo microbiota-intestino-cérebro são associadas a maior vulnerabilidade às infecções, bem como, *per se*, a disfunção neurológica. Neste estudo foram avaliadas alterações intestinais, parâmetros comportamentais e parâmetros inflamatórios após modelo de meningite pneumocócica experimental em ratos Wistar adultos. Os animais receberam injeção na cisterna magna de 10 µL de suspensão de *S. pneumoniae* no grupo meningite ou solução salina estéril para o grupo controle. Dez dias após a indução do modelo experimental, foram realizados os testes comportamentais de habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos novos e esquiva inibitória. Após os testes, os animais foram eutanasiados e retiradas as estruturas cerebrais, hipocampo e córtex pré-frontal, para análises de citocinas, e porções intestinais, para avaliação do comprimento das vilosidades e profundidade das criptas intestinais. Como resultados, o grupo meningite apresentou aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , no córtex pré-frontal 10 dias após a infecção. Embora livres de infecção, na avaliação intestinal observou-se dano significativo nas vilosidades e criptas intestinais dos animais do grupo meningite. Ainda, foram verificados prejuízo de parâmetros comportamentais no grupo meningite, com prejuízo da memória de habituação, memória de reconhecimento e memória aversiva. Diante dos resultados alcançados, sugere-se que a meningite pode alterar a homeostasia do eixo cérebro-intestino levando a danos cognitivos de longo prazo.

Palavras-chave: meningite pneumocócica, alteração intestinal, neuroinflamação, dano cognitivo.

ABSTRACT

Pneumococcal meningitis is a severe infection of the central nervous system (CNS) with a high mortality and morbidity rate worldwide. *Streptococcus pneumoniae* has several virulence mechanisms that allow it to invade the CNS and, reaching the cerebrospinal fluid (CSF), induce a robust immune response in the host. The triggered inflammatory cascade increases the blood-brain barrier's permeability, leading to pleocytosis and inflammation. Despite therapeutic advances, pneumococcal meningitis is associated with persistent neurological impairment in a large proportion of survivors. It is known that severe infections have the potential to generate dysfunction in the intestinal microbiome. Changes in the homeostasis of the microbiota-gut-brain axis are associated with greater vulnerability to infections and, per se, neurological dysfunction. This study evaluated intestinal changes, behavioral parameters, and inflammatory parameters after an experimental pneumococcal meningitis model was used in adult Wistar rats. The animals received an injection into the cisterna magna of 10 μ L of *S. pneumoniae* suspension in the meningitis group or sterile saline solution for the control group. Ten days after the induction of the experimental model, behavioural tests of habituation to the open field, recognition of new objects and inhibitory avoidance were carried out. After the tests, the animals were euthanized, and the brain structures, hippocampus and prefrontal cortex were removed for cytokine analysis and intestinal portions to evaluate the length of the villi and depth of the intestinal crypts. As a result, the meningitis group showed increased levels of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β e TNF- α , in the prefrontal cortex ten days after infection. Although free of infection, in the intestinal evaluation, significant damage was observed in the villi and intestinal crypts of the animals in the meningitis group. Furthermore, impairment of behavioral parameters was observed in the meningitis group, with impairment of habituation memory, recognition memory and aversive memory. Given the results achieved, it is suggested that meningitis can alter the homeostasis of the brain-gut axis, leading to long-term cognitive damage.

Keywords: pneumococcal meningitis, intestinal microbiota, neuroinflammation, cognitive impairment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta.

AHR: Receptor de Hidrocarbonetos de Arila; do inglês *Aryl-Hydrocarbon Receptor*.

AVC: Acidente Vascular Cerebral.

BHE: Barreira Hematoencefálica.

Casp1: Caspase 1.

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais.

ChoP: Fosforilcolina Pneumocócica; do inglês *Phosphorylcholine*.

DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Dano; do inglês *Damage Associated Molecular Patterns*.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico; do inglês *DeoxyriboNucleic Acid*.

EAS: Encefalopatia Associada à Sepse.

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio.

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio.

H. influenza: Haemophilus influenza.

IFN- γ : Interferon Gama.

IL: Interleucina.

LCR: Líquido Cefalorraquidiano.

LTA: Ácido Lipoteicoide; do inglês *Lipoteichoic Acid*.

MP: Meningite Pneumocócica.

NF- κ B: Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta; do inglês *Nuclear Factor Kappa Beta*.

NLRs: Receptores do tipo NOD; do inglês *Nucleotide Binding and Oligomerization Domain Like Receptors*.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

PAFR: Receptor de Fator de Ativação de Plaquetas; do inglês *Platelet Activating Factor Receptor*.

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos; do inglês *Pathogen Associated Molecular Pattern*.

PECAM-1: Molécula de Adesão Celular Endotelial Plaquetária 1; do inglês *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*.

pIgR: Receptor Polimérico de Imunoglobulina; do inglês *Polymeric Immunoglobulin Receptor*.

Ply: Pneumolisina; do inglês *Pneumolysin*.

PMN: Polimorfonucleares.

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões; do inglês *Patter Recognition Receptors*.

PsaA: Antígeno A de superfície do Pneumococos; do inglês *Pneumococcal Surface Antigen A*.

PspC: Proteína C de Superfície de Pneumococos; do inglês *Pneumococcal Surface Protein C*.

RAGE: Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada; do inglês *Receptor for Advanced Glycation End Products*.

SINAN; Sistema de Informações de Agravos de Notificação.

SNC: Sistema Nervoso Central.

S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*.

SUS: Sistema Único de Saúde.

TGF- α : Fator Transformador de Crescimento Alfa; do inglês *Transforming Growth Factor Alpha*.

TLRs: Receptores do tipo Toll; do inglês *Toll Like Receptors*.

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa; do inglês *Tumor Necrosis Factor Alpha*.

VEGF- β : Fator de Crescimento Endotelial Vascular Beta; do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor Beta*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	13
1.2. FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA.....	15
1.3. COMPROMETIMENTO NEUROLÓGICO NA MENINGITE.....	18
1.4. EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO.....	20
1.5. JUSTIFICATIVA.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Local de realização da pesquisa.....	26
3.2. DESENHO DO ESTUDO.....	26
3.2.1. Microrganismo infectante para indução de meningite.....	26
3.2.2. Modelo animal de meningite.....	26
3.2.3. Desenho experimental.....	27
3.3. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	29
3.3.1. Teste de habituação a campo aberto.....	29
3.3.2. Teste de reconhecimento de objetos.....	29
3.3.3. Esquiva inibitória.....	30
3.4. NÍVEIS DE CITOCINAS.....	31
3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA INTESTINAL.....	31
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
3.7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	32
4. RESULTADOS.....	33
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS.....	55

INTRODUÇÃO

A meningite é conhecida desde a antiguidade, com relatos de Hipócrates e Galeno. A primeira descrição detalhada data de 1661, por Thomas Willis em “*A Description of an Epidemical Fever*” (Schreiber e Mathys, 1991). Hoje é definida como um processo inflamatório das membranas leptomeníngeas, principalmente da aracnóide e da pia-máter, que envolvem o encéfalo e a medula espinhal, bem como o espaço subaracnóideo (Costerus et al., 2017). A doença pode ser decorrente de agentes infecciosos incluindo vírus, bactérias, fungos, príons, protozoários ou helmintos, ou não infecciosos, como doenças autoimunes, fármacos/vacinas, neoplasias ou traumatismo crânio encefálico (Ellis et al., 2019). As meningites de origem infecciosa, principalmente as causadas por vírus e bactérias, são as mais importantes do ponto de vista de saúde pública, pela magnitude de sua ocorrência e pelo potencial de produzir surtos e epidemias (Thigpen et al., 2011). Dentre estas, a meningite causada por infecção bacteriana tende a ser a mais grave, com alta taxa de letalidade. Os principais agentes etiológicos causadores da meningite bacteriana são o *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e o *Haemophilus influenzae* (Bijlsma et al., 2016).

O *S. pneumoniae* é um diplococo Gram-positivo encapsulado com 0,5 a 1,2 µm de diâmetro (Figura 1). A cápsula bacteriana do pneumococo é um importante fator de virulência, sendo a base da classificação dos mais de 90 sorotipos conhecidos desta bactéria (Fitzgerald e Waterer, 2019). O pneumococo é comensal da nasofaringe humana e, em indivíduos predispostos, pode levar a doenças graves, dentre elas a meningite pneumocócica (Henriques-Normark e Tuomanen, 2013).

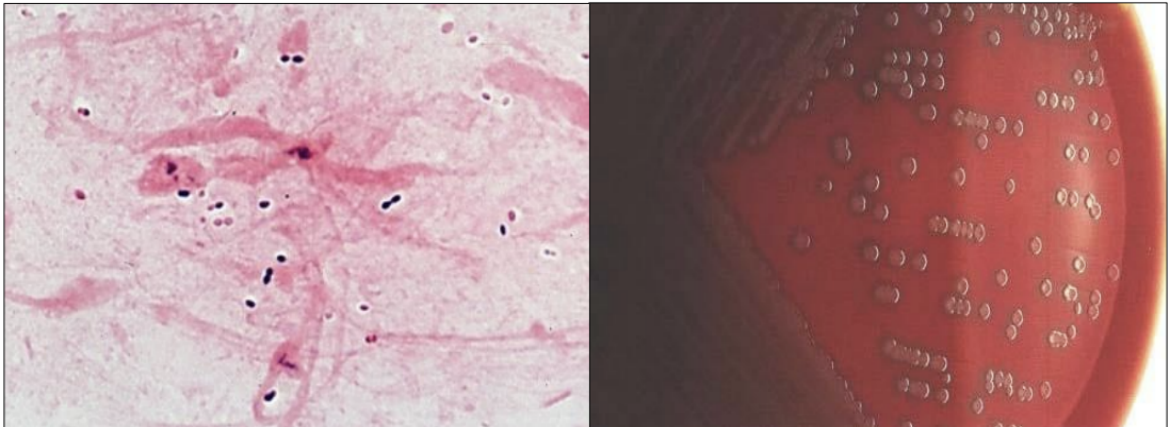


Figura 1 - *S. pneumoniae* - Coloração de Gram e crescimento em ágar sangue. Gram de amostra clínica (lavado broncoalveolar) de *S. pneumoniae* apresentando morfologia clássica de diplococos Gram positivos (lado esquerdo). No lado direito, a figura mostra morfologia das colônias após cultura em ágar sangue (Murray, 2014).

A meningite pneumocócica é uma das mais complexas e graves infecções do sistema nervoso central (SNC). Tipicamente, os pacientes apresentam sinais de infecção superpostos a evidência clínica de irritação meníngea e comprometimento neurológico, como cefaleia, fotofobia, irritabilidade, embotamento da consciência e rigidez da nuca (Sigfrid et al., 2019). Apesar dos avanços terapêuticos, a intensa resposta inflamatória desencadeada no hospedeiro é associada a alterações neuropsiquiátricas persistentes em grande parte dos sobreviventes (Lucas et al., 2016). Estudos apontam que aproximadamente 50% dos sobreviventes apresentam algum tipo de sequelas, como convulsões, cegueira, perda auditiva, deficiência motora, prejuízo na memória e aprendizado além de patologias psiquiátricas (Ellis et al., 2019).

1.1. EPIDEMIOLOGIA

A meningite bacteriana tem distribuição universal. Entretanto sua expressão epidemiológica é determinada com base nas variáveis de região, patógeno, clima e características do hospedeiro. A incidência varia grandemente entre os países, com ênfase na existência de aglomerados populacionais, nas características socioeconômicas da população e na cobertura vacinal (Acevedo et al., 2019). A *Escherichia coli* e *S. agalactiae* causam cerca de 35% dos casos de meningite neonatal de início precoce e, fora do período neonatal, o *S. pneumoniae*

(72%) e a *Neisseria meningitidis* (11%) são os patógenos mais prevalentes nas meningites bacterianas. Os grupos etários mais vulneráveis são crianças menores de cinco anos e adultos maiores de 60 anos de idade. Imunodeficiências, desnutrição e outras comorbidades são fatores que também aumentam a vulnerabilidade (Mcintyre et al., 2012; Hasbun, 2022).

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. Anualmente, a meningite bacteriana causa aproximadamente 318.000 mortes em todo o mundo (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 80 por 100.000 indivíduos por ano em países de baixa e média renda (Hasbun, 2019). 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).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), através do Programa Nacional de Imunização, disponibiliza vacinas contra os principais patógenos, como a Tríplice Viral (contra os vírus da caxumba, rubéola e sarampo), a BCG (contra a meningite tuberculosa), a penta valente (contra o *H. influenza*), a meningocócica C e ACWY (contra as doenças meningocócicas) e a pneumocócica 10-valente e 23-valente (contra a meningite pneumocócica). 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 (SINAN), figura 2. A meningite viral é a mais frequente (121.955 casos), seguida pela etiologia bacteriana (87.993 casos). Destas, as mais frequentes foram: meningites por outras bactérias (40.801 casos); meningite meningocócica (26.436 casos); meningite pneumocócica (14.132 casos); meningite tuberculosa (4.916 casos) e meningite por *H. influenza* (1.708 casos). É importante destacar que houve uma parcela significativa de notificações sem a identificação do agente etiológico (43.061 casos de meningite não especificada, 10.464 casos de meningite por outras etiologias e 2.171 com etiologia ignorada/em branco) o que sugere uma evidente subnotificação de todas as outras causas (SINAN).

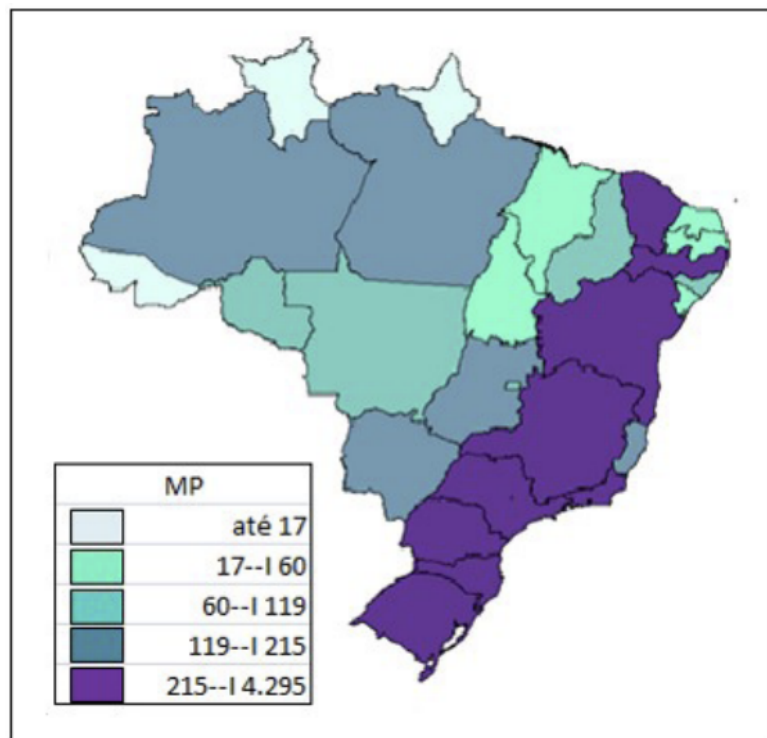


Figura 2 - Número de casos de meningite por pneumococo no Brasil por estado de 2009 a 2018. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net. (Silva et. al; 2021).

No estado de Santa Catarina, foram confirmados 891 casos de meningite em 2018, 970 em 2019, 379 em 2020, 358 em 2021, 399 em 2022 e 812 em 2023 (SINAN). A redução no número de casos confirmados de meningite no estado entre os anos de 2020 a 2022 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). Com o relaxamento destas medidas de cuidado, voltamos a apresentar uma crescente nos casos de meningite a partir de 2023. Em 2023, Santa Catarina notificou 69 casos de meningite pneumocócica no estado com letalidade de 42% (SINAN).

1.2. FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE PNEUMOCÓCICA

O *S. pneumoniae* é um importante residente comensal da nasofaringe humana, onde geralmente leva à colonização assintomática. Esse patógeno é transmitido principalmente através de tosse e espirros, e é mais facilmente encontrado entre crianças pequenas, onde coloniza cerca de 37% dos indivíduos, podendo este número atingir até 58% das crianças em situações de aglomeração,

como creches (Bijlsma et al., 2016). Em adultos, a aglomeração também pode levar ao aumento de colonizados, especificamente em hospitais, instituições de longa permanência, abrigos e prisões, onde foram relatados 40% de colonizados, em comparação com 4 a 15% na população adulta geral (Van De Beek et al., 2016).

Para promover um estado patológico, a bactéria deve ter mecanismos de virulência suficientemente eficazes para suplantiar outros patógenos que colonizam o mesmo nicho, atravessar as barreiras naturais da mucosa respiratória, escapar do sistema imunológico do hospedeiro, aderir e adentrar ao epitélio local (Mcgill et al., 2016).

O pneumococo é uma bactéria encapsulada, o que confere muitas características protetoras e de virulência. A cápsula polissacarídica do pneumococo repele o muco diminuindo a probabilidade de aprisionamento (Nelson et al., 2007), além de servir como escudo contra sua opsonização (Koedel et al., 2010). A cápsula pneumocócica realiza um processo chamado variação de fase (Li-Korotky et al., 2008), onde a quantidade de polissacarídeo na cápsula varia de opaca (cápsula grossa) a transparente (cápsula fina), cobrindo ou expondo os sítios de ligação na superfície do pneumococo, respectivamente (Weiser et al., 1994)

Os mecanismos conhecidos de adesão e transmigração epitelial do *S. pneumoniae* são através da fosforilcolina pneumocócica (ChoP) e da proteína de ligação à colina pneumocócica (PspC). No primeiro, a ChoP pode se ligar ao receptor de fator de ativação de plaquetas (PAFR) em células epiteliais entrando na via de reciclagem deste, que transporta a bactéria para a membrana basal da célula epitelial hospedeira (Radin et al., 2005). O segundo mecanismo envolve a ligação PspC com o receptor epitelial polimérico de imunoglobulina (plgR) usando a via de reciclagem do plgR, análoga para a via do PAFR, para ser transportado entre as membranas apicais e basais da célula epitelial (Mook-Kanamori et al., 2011). A migração inter ou pericelular são outras possibilidades onde as bactérias podem atravessar as camadas de células epiteliais ou endoteliais (Pancholi et al., 2003). A partir de então, o *S. pneumoniae* é capaz de alcançar a circulação sanguínea (Somand e Meurer, 2009).

A invasão bacteriana no SNC ocorre com o avanço do patógeno pelo endotélio da barreira hematoencefálica (BHE). A adesão inicial parece ser mediada pela ligação da proteína A de superfície de pneumococos (PspA) aos receptores de laminina expressos em células endoteliais do cérebro, que promove aumento do

PAFR na superfície endotelial (Orihuela et al., 2009). O pneumococo pode transgredir a BHE através da interação entre a ChoP com o PAFR, permitindo-lhe atravessar da corrente sanguínea para o líquido cefalorraquidiano (LCR). Também pode alcançar o espaço subaracnóideo pela via paracelular por disfunção da integridade da BHE. Alcançando o LCR, as bactérias encontram um local com poucas defesas do hospedeiro e multiplicam-se rapidamente. Com o aumento da densidade bacteriana, os pneumococos atingem a fase de crescimento estacionária e realizam autólise, em resposta a condições de estresse e privação de nutrientes, além da lise decorrente de tratamentos farmacológicos (Mook-Kanamori et al., 2011).

A lise bacteriana leva à liberação de componentes bacterianos altamente imunogênicos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o ácido lipoteicoico, peptidoglicano, DNA e fragmentos da parede celular (Mook-Kanamori et al., 2011; Van De Beek et al., 2016). Estes PAMPs são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos através da ligação aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo os receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) (Van De Beek et al., 2016), iniciando a sinalização intracelular que resulta na liberação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (Koedel et al., 2000; Costerus et al., 2017). O NF- κ B se desloca para o núcleo da célula onde se liga ao DNA promovendo a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, induzindo uma cascata de reações inflamatórias mediadas principalmente pelas citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) - 1 β e IL-6 (Koedel et al., 2000).

O TNF- α , IL-1 β e IL-6, considerados as principais citocinas de resposta precoce, 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). Em consequência à produção de citocinas, leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados e, grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas aumentando a permeabilidade da BHE (Kastenbauer et al., 2002). As células gliais, endoteliais, ependimais e macrófagos residentes no cérebro podem produzir citocinas e moléculas pró-inflamatórias em resposta a replicação e componentes bacterianos (Moreillon e Majcherczyk, 2003).

Esses eventos inflamatórios retroalimentam-se em um ciclo vicioso entre o estresse oxidativo e inflamação (Somand e Meurer, 2009), conforme demonstrado

na figura 3, e podem causar danos cerebrais como edema cerebral, aumento da pressão intracraniana, hipoxemia, além de problemas trombóticos e vasculite com a lesão neuronal e repercussões locais ou difusas, muitas vezes irreversíveis (Brandt, 2010; Engelen-Lee et al., 2016).

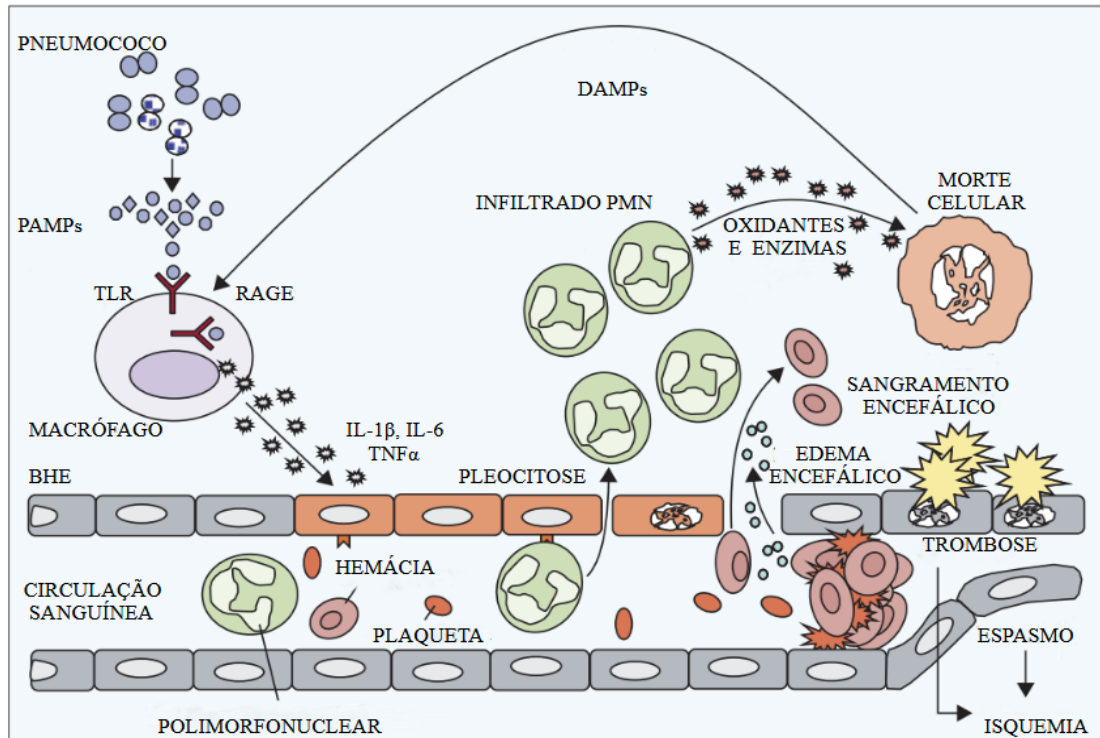


Figura 3. Principais etapas patogênicas da meningite pneumocócica. A meningite bacteriana se desenvolve quando os patógenos atingem o espaço subaracnóideo preenchido pelo LCR. Há autólise ou lise bacteriana induzida pelo hospedeiro ou antibióticos com liberação de diversos PAMPs. A sua presença é reconhecida por células imunocompetentes residentes por meio de receptores de reconhecimento de padrões. O ácido lipoteicoide (LTA), a pneumolisina (Ply) e o DNA são reconhecidos por TLR1/2, TLR4 e TLR9, respectivamente. Essas interações resultam na ativação da enzima caspase 1 (Casp1), que catalisa a conversão da pró-forma de citocinas da família IL-1 na molécula ativa e de fatores de transcrição, como fator nuclear- κ B (NF- κ B). Há produção de diversos fatores pró-inflamatórios como as IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Há pleocitose, exagerando e perpetuando a inflamação. Produtos citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), danificam o tecido hospedeiro e as células lesadas, por sua vez, liberam os chamados DAMPs, incluindo a proteína 14 relacionada com mielóides (MRP14) e a caixa de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), que pode alimentar a inflamação interagindo com receptores, como TLR4 e receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Ocorre vasculite e vasoespasmo, causando hipoperfusão cerebral e isquemia, além de edema cerebral, hemorragia cerebral e trombose, piorando a perfusão e oxigenação tecidual. (Adaptado de Costerus et al., 2017 e de Van De Beek et al., 2021).

1.3. COMPROMETIMENTO NEUROLÓGICO NA MENINGITE

As principais características histopatológicas da meningite bacteriana são a turbidez do LCR e, por vezes, com exsudato evidente dentro das leptomeninges sobre a superfície do cérebro (Mook-Kanamori et al., 2011). Há extensa inflamação granulocítica nos espaços subaracnóide e ventricular com significativo dano

neuronal, afetando principalmente o córtex cerebral e o hipocampo. A apoptose neuronal no hipocampo representa o principal processo neuropatológico responsável pelo prejuízo cognitivo em sobreviventes da meningite bacteriana, estando o dano hipocampal relacionado aos processos de memória (Weisfelt et al., 2006).

Alguns autores demonstraram que a meningite bacteriana está associada a efeitos danosos à plasticidade neuronal, representados por redução da densidade de células neuronais no córtex pré-frontal e hipocampo. Lesões nestas estruturas são conhecidas por levar a distúrbios de orientação e causar prejuízos em tarefas complexas (Mogensen et al., 2005). As sequelas são notadas em aproximadamente 50% dos sobreviventes, incluindo graves distúrbios neurológicos e neuropsicológicos (Zelano e Westman, 2020), sendo inclusive evidenciada associação com doenças psiquiátricas e doenças neurodegenerativas (Chen et al., 2016).

Sobreviventes de meningite bacteriana são cinco vezes mais propensos a desenvolver transtornos mentais, entre eles o retardo mental (Christie et al., 2017). Os impactos funcionais, psicológicos, sociais e econômicos das sequelas neurológicas após a meningite podem ser devastadores para pacientes, famílias e comunidades. As sequelas neurológicas estão presentes mesmo em países desenvolvidos com boa cobertura vacinal e disponibilidade de tratamentos adequados ou entre aqueles pacientes considerados como tendo feito uma boa recuperação da meningite bacteriana (Kloek et al., 2020).

As complicações de curto prazo mais comuns são a hidrocefalia, abscesso intracraniano e edema cerebral (Adil et al., 2021). As sequelas tardias mais presentes são a perda auditiva, déficits cerebrais focais e convulsões (Lucas et al., 2016). Lactentes com meningite tem circunferência encefálica menor, quociente de inteligência (QI) mais baixo e linguagem atrasada em comparação com crianças controle (Baker et al., 1996). Crianças acometidas pela meningite apresentam, também, prejuízo no desenvolvimento da habilidade de leitura, alterações comportamentais e resultados significativamente piores nas avaliações de inteligência e habilidades neuropsicológicas de alto nível, como habilidades organizacionais, resolução de problemas, fluência verbal e capacidade mental (Grimwood et al., 2000).

As crianças sobreviventes da meningite apresentam probabilidade 3 vezes maior de apresentar deficiência grave como perda auditiva, convulsões, déficits motores e prejuízo cognitivo quando comparadas a um grupo controle

comunitário (Edmond et al., 2010). Mesmo as crianças que são sobreviventes aparentemente saudáveis da doença, mostraram atrasos no desenvolvimento e problemas na capacidade cognitiva (Dezfouli e Khosravi, 2020).

1.4. EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

Há muito se sabe que o intestino humano é habitat de microrganismos comensais. Porém apenas recentemente começou-se a perceber a extraordinária complexidade desta simbiose. O conceito de “eixo microbiota-intestino-cérebro” se refere a interação entre o sistema entérico, sua microbiota e o SNC (Chang et al., 2022). A microbiota intestinal é um ecossistema composto por mais de 100 trilhões de células microbianas (Ley et al., 2008) chegando à proporção de até 10 bactérias para cada célula humana. Além de apresentar um conteúdo genômico contendo 100 vezes mais genes do que o genoma humano (Thursby e Juge, 2017; Douglas et al., 2020).

A microbiota intestinal é formada desde os primeiros estágios da vida embrionária (Codagnone et al., 2019) e é composta principalmente por bactérias, vírus, arqueobactérias e fungos. Esta microbiota compõe um ecossistema importante com aproximadamente 1000 a 5000 diferentes espécies, com 99% das bactérias variando entre os filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Cryan et al., 2019). Esta composição varia conforme a idade, uso de fármacos, patologias, hábitos dietéticos, estresse e fatores genéticos, conforme destacado na figura 4 (Slyepchenko et al., 2017).

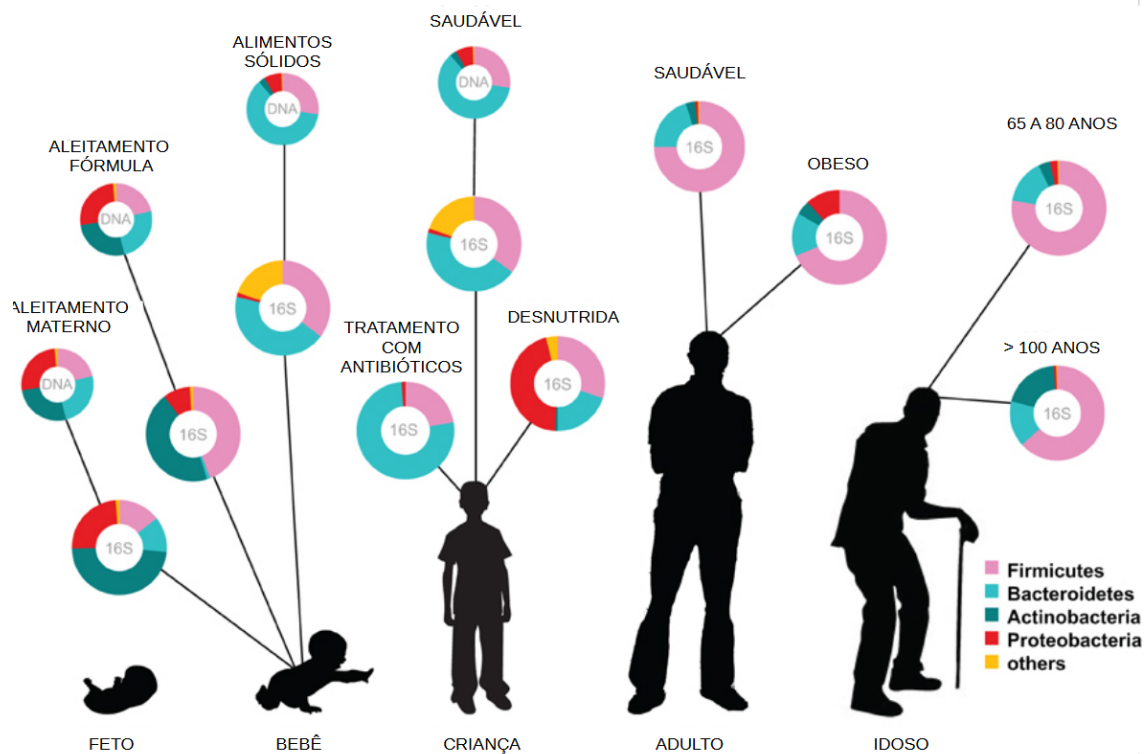


Figura 4 - Microbiota humana: início e formação ao longo das fases da vida e perturbações. O gráfico fornece uma visão global da abundância relativa dos principais filos da composição da microbiota humana em diferentes fases da vida. Medido por RNA 16S ou abordagens metagenômicas (DNA). (Adaptado de Ottman et al., 2012).

A microbiota intestinal possui uma interação complexa com o hospedeiro. Faz uma primeira barreira na defesa do trato intestinal contra a colonização por patógenos por exclusão competitiva e produção de bacteriocinas (Guarner e Malagelada, 2003). Apresenta funções protetoras indiretas auxiliando na integridade da mucosa intestinal, estimulando o crescimento e diferenciação das células epiteliais, além de ser fundamental para o desenvolvimento e homeostase do sistema imunológico (Guarner e Malagelada, 2003). Tem papel essencial envolvendo digestão e absorção da dieta, especialmente na fermentação dos carboidratos não digeríveis, dando origem a metabólitos importantes, incluindo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato (Koh et al., 2016; Morrison e Preston, 2016).

Outros produtos importantes são os metabólitos do triptofano, também produzidos pela microbiota comensal que atuam como agonistas do receptor de hidrocarbonetos de arila (AHR), incluindo ácido indol-3-acético, indol-3-acetaldeído, indol-3-aldeído, triptamina e 3-metilindol (Rothhammer et al., 2016; Gutierrez-Vazquez e Quintana, 2018). Esses metabólitos podem atravessar a BHE e ativar os

AHR em astrócitos e micróglia. Uma vez ativado, este receptor suprime a ativação do NF- κ B, evitando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Dokalis e Prinz, 2019).

O eixo microbiota-intestino-cérebro é constituído por vias de comunicação bidirecionais complexas compostas pelo sistema nervoso periférico (em especial, o nervo vago e sistema nervoso entérico), sistema imunológico, sistema neuroendócrino e pelo sistema circulatório (Doifode et al., 2021). Há evidências de que a microflora intestinal influencia fortemente a arquitetura e função cerebral durante todo o ciclo de vida do hospedeiro (Margolis et al., 2021; Honarpisheh et al., 2022).

O trato gastrointestinal possui muitas células imunes e se mantém em comunicação com as células microbianas que habitam o intestino delgado e grosso, representado pela figura 5 (Cryan et al., 2019). O sistema imunológico intestinal mantém tolerância aos microrganismos comensais e imunidade contra agentes patogênicos. No entanto, o desequilíbrio entre o sistema imunológico do hospedeiro e a microbiota modula a inflamação e pode contribuir para diversas doenças. Os PAMPs são reconhecidos por PRRs e desencadeiam cascatas de sinalização que ativam fatores de transcrição e promovem a produção de mediadores pró-inflamatórios (Kumar et al., 2013; Heckenberg et al., 2014). Essa resposta inflamatória pode aumentar a permeabilidade intestinal, contribuindo para translocação de componentes bacterianos e outras substâncias para a corrente sanguínea, causando uma reação inflamatória que leva a um aumento da permeabilidade da BHE, desencadeando a ativação de astrócitos e micróglia (Ma et al., 2019).

A relação entre o eixo microbiota-intestino-cérebro e doenças neuropsiquiátricas, bem como o declínio cognitivo está em fase exploratória, mas diversos estudos têm demonstrado que esta relação existe e pode ser significativa (Doifode et al., 2021; Generoso et al., 2021; Chang et al., 2022).

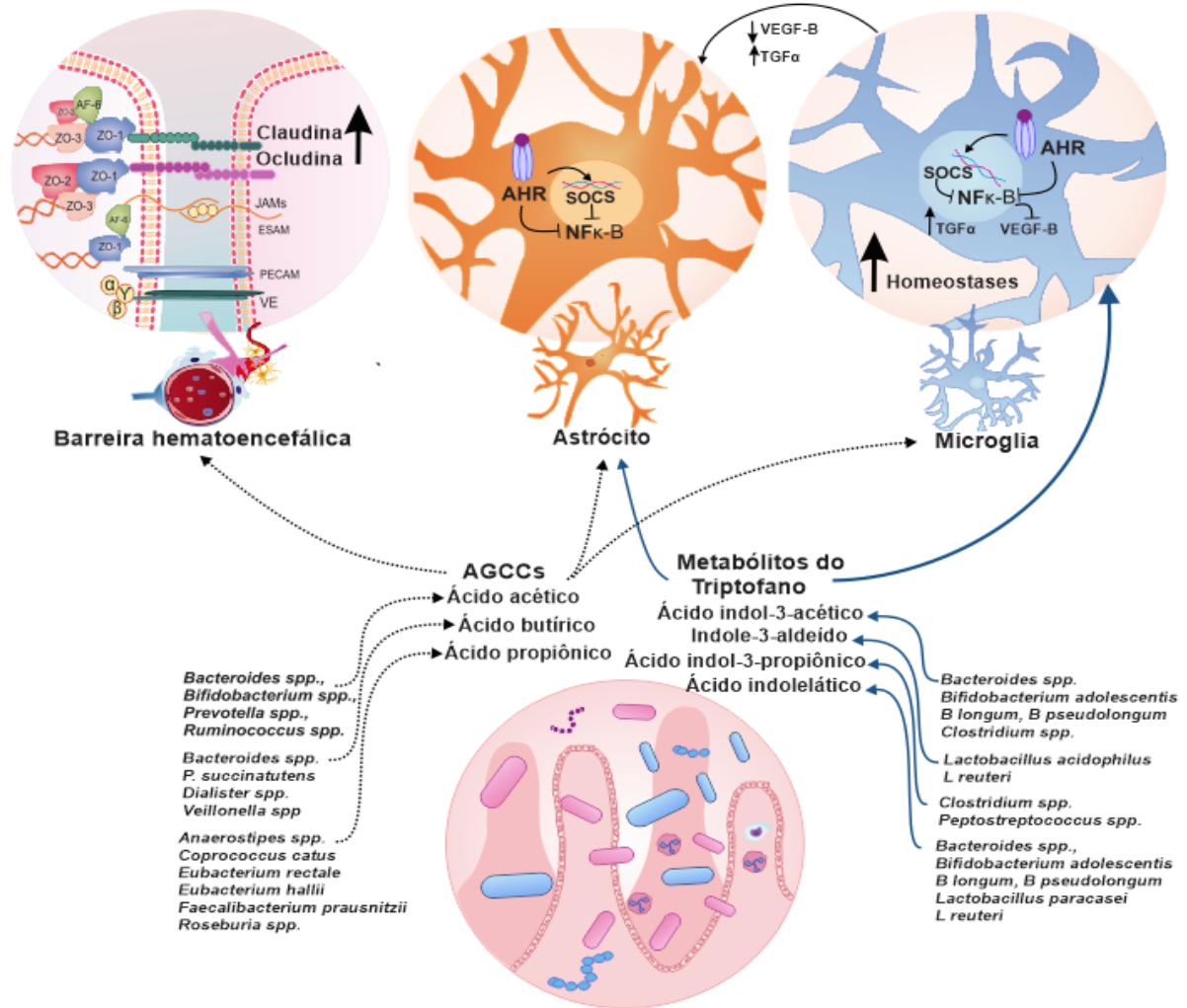


Figura 5 - Comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro. Os AGCC, auxiliam na regulação da permeabilidade da BHE aumentando a expressão de claudina e ocludina aumentando a força das junções e consequentemente diminuindo a permeabilidade da BHE. Também atravessam a BHE e estimular a maturação e homeostase das células microgliais, inclusive bloqueando fatores de transcrição pró inflamatórios. Os metabólitos do triptofano atravessam a BHE e agem como agonistas do AHR em astrócitos e na micróglia, suprimindo a ativação do NF-κB e evitando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Promovem também o aumento da expressão do TGF-α, que atua nos astrócitos suprimindo suas atividades pró-inflamatórias (Barichello, 2020).

1.5. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nos cuidados de saúde e na vacinação as taxas de mortalidade por meningite pneumocócica continuam altas. Um número considerável de sobreviventes apresenta sequelas cognitivas, incluindo prejuízo de aprendizagem e perda de memória. No entanto, os mecanismos biológicos que desencadeiam essas alterações cognitivas após meningite bacteriana não são totalmente elucidados. Assim, estudos envolvendo o eixo microbiota-intestino-cérebro, que tem sido implicado na patogênese de diversas doenças neuropsiquiátricas, são de extrema importância para tentar explicar possíveis mecanismos adicionais envolvidos nas alterações cognitivas pós-meningite. Com esse trabalho busca-se aperfeiçoar o conhecimento para prevenção de sequelas e melhora na qualidade vida dos pacientes acometidos por essa grave infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações comportamentais, parâmetros inflamatórios encefálicos e alterações histológicas intestinais pós meningite pneumocócica experimental.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a memória e aprendizagem em ratos Wistar adultos 10 dias após modelo de meningite por *S. pneumoniae*.
- Avaliar os níveis de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL10) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após indução do modelo de meningite pneumocócica experimental.
- Avaliar o comprimento das vilosidades e profundidade das criptas do íleo de ratos Wistar adultos 10 dias após indução do modelo experimental de meningite pneumocócica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Neurologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. O estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC, sob o protocolo 73/2022 (Anexo A). Sendo assim, todos os cuidados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos foram adotados.

3.2. DESENHO DO ESTUDO

3.2.1. Microrganismo infectante para indução de meningite

A cepa do sorotipo III de *S. pneumoniae* foi cultivada em 5 mL de meio de cultura *Todd Hewitt Broth*®. Então, foi diluída em meio fresco e cultivada até a fase logarítmica. No dia do experimento, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rotações por minuto (rpm) e ressuspensa em solução salina estéril até a concentração de 5×10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) (Barichello et al., 2012).

3.2.2. Modelo animal de meningite

Para esse projeto, foram utilizados 46 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com 60 dias de vida, pesando entre 200 e 250g, obtidos na colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram devidamente anestesiados com administração intraperitoneal (i.p.) de cetamina (6,6 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg). Em seguida, foi inoculado na cisterna magna do animal 10 µL de solução com 5×10^9 UFC/ml de *S. pneumoniae* (grupo meningite) ou 10 µL de solução salina estéril (grupo controle). Imediatamente após a indução da meningite, os animais receberam reposição volêmica e retornaram para

suas gaiolas. Em 18 horas após a indução, os animais foram novamente anestesiados para a confirmação da meningite com coleta de 5 μ L de LCR que foi incubado a 35 °C com 5% de CO² em ágar sangue de ovelha (Barichello et al., 2012). Após esse procedimento, os animais receberam tratamento com o antimicrobiano ceftriaxona (100 mg/kg i.p.), duas vezes ao dia, por 7 dias.

3.2.3. Desenho experimental

Para responder os objetivos propostos, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: meningite (n = 26, eram necessários 20 animais vivos, assim foi considerado 30% de mortalidade (Barichello et al., 2013), por isso o acréscimo de 06 ratos) e controle (n = 20). Dez dias após a indução da meningite, foram realizados os testes comportamentais de habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos novos e esquiva inibitória. Para o teste comportamental de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos novos, foram utilizados os mesmos animais (grupo controle = 10 e grupo meningite = 10). Para o teste de esquiva inibitória, outros 20 animais (grupo controle = 10 e grupo meningite = 10). Essa divisão foi necessária em função de que o teste de esquiva inibitória é um teste mais invasivo, onde é o animal é exposto a um choque, podendo alterar outros tipos de comportamento. Logo após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação para coleta das estruturas cerebrais hipocampo e córtex pré-frontal para análises de mediadores inflamatórios, e íleo para comprimento das vilosidades e profundidade das criptas intestinais (figura 6 e 7).

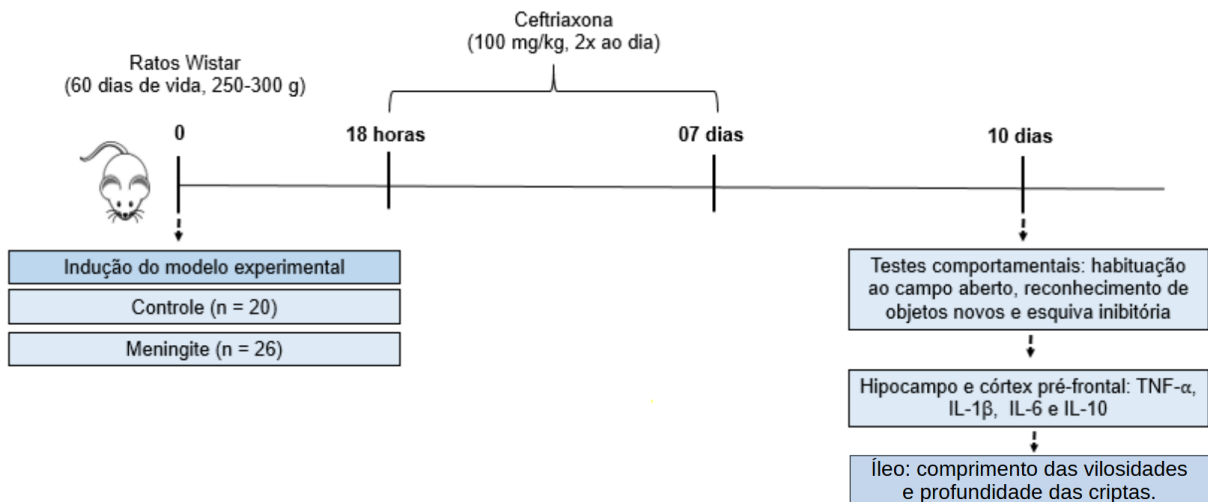


Figura 6 - Representação do protocolo experimental. Fonte: Figura elaborada pelo autor.

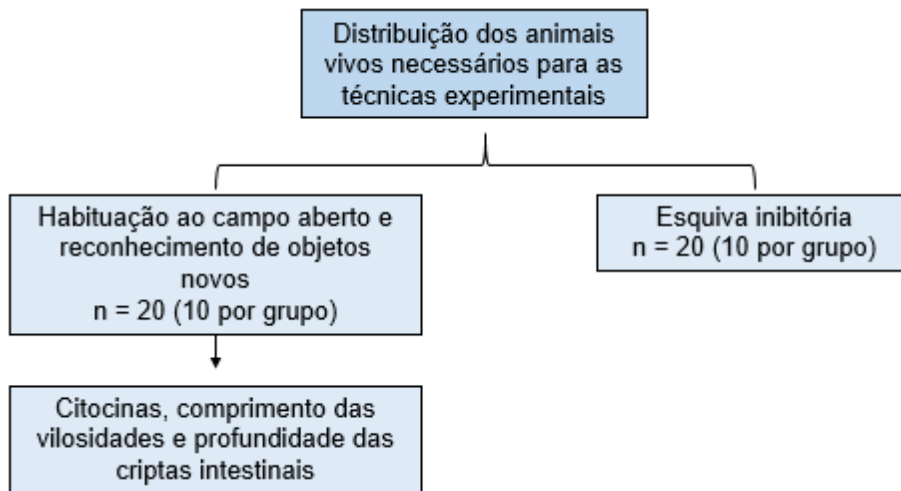


Figura 7 - Distribuição dos animais para as técnicas experimentais. Figura elaborada pelo autor.

3.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1. Teste de habituação a campo aberto

Neste teste, o animal foi avaliado no aparato de campo aberto, a fim de avaliar as atividades locomotoras e exploratórias, figura 8. O aparelho mede 40 cm por 60 cm de campo aberto cercado por 50 cm de paredes feitas de madeira com um vidro frontal. O piso é dividido em 9 retângulos marcados por linhas pretas (figura 8). Na sessão treino, os animais foram gentilmente colocados no quadrante posterior esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por 5 minutos. Após isso, foram devolvidos às suas caixas e em 24 horas submetidos a uma nova sessão (teste). Durante os 5 minutos de exploração, todas as vezes que o animal cruzou os quadrantes (cruzamentos) ou se apoiou com as patas traseiras, levantando as dianteiras (levantamentos, demonstrando atividade exploratória) foram contabilizadas. A diminuição do número de cruzamentos e levantamentos entre as duas sessões foi tomada como uma medida de retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

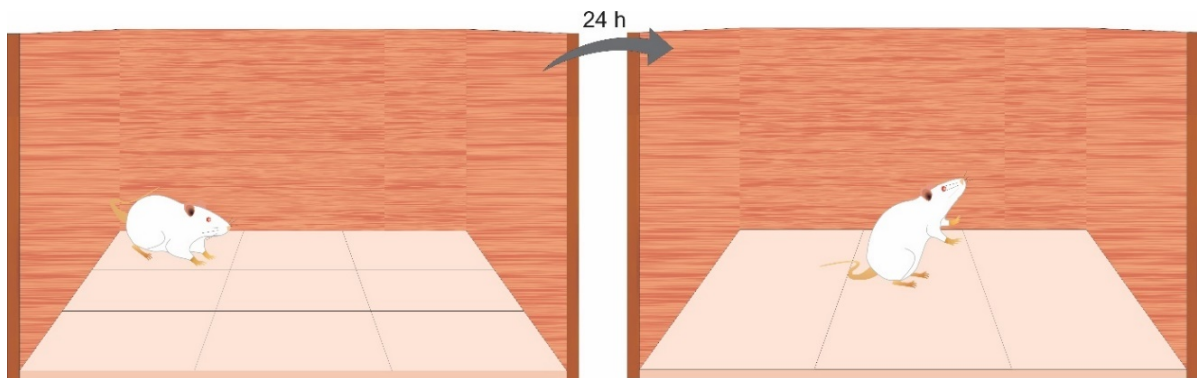


Figura 8 - Teste de habituação ao campo aberto. Fonte: Generoso, 2017.

3.3.2. Teste de reconhecimento de objetos

Neste teste foi avaliado a memória de reconhecimento (figura 9). Primeiramente foi realizada a sessão treino, onde o animal foi cuidadosamente colocado no quadrante posterior esquerdo do aparelho, no qual explorará o ambiente por 5 minutos, servindo como habituação do animal ao novo ambiente. No segundo dia os animais foram recolocados no aparato, no qual havia dois objetos iguais (forma, tamanho e cor iguais), foi contabilizado o tempo que o animal explorou

cada objeto (A e B). No dia seguinte (24 horas após) foi avaliada a memória de longa duração, onde realizou-se o mesmo procedimento, trocando o objeto B pelo objeto C (diferente do objeto A), registrando-se, assim, o tempo de exploração gasto em cada objeto (De Lima et al., 2005).

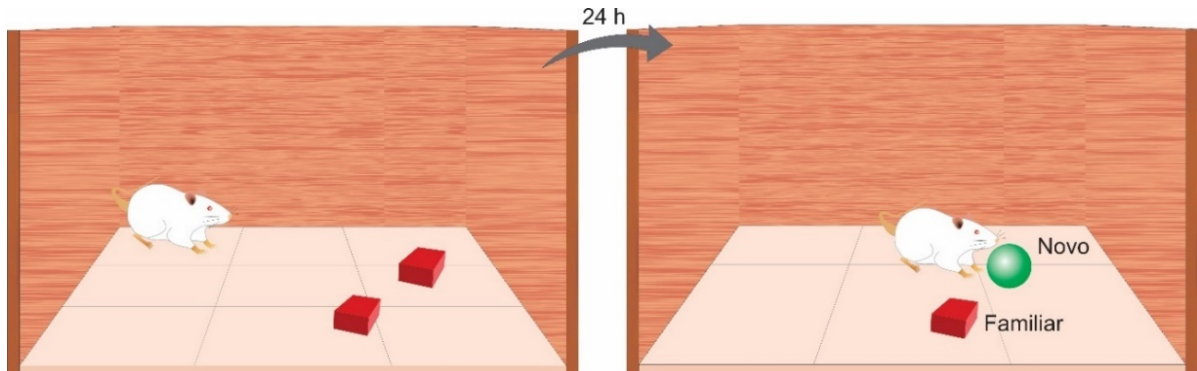


Figura 9- Teste de reconhecimento de objetos novos. Fonte: Generoso, 2017.

3.3.3. Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm (figura 10). Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi contabilizado. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,3 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste foi realizada 24 h após a sessão treino. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e o tempo que ele levou para descer (latência) foi medido, porém não foi aplicado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. A figura 10 exemplifica o teste de esquiva inibitória que avalia a memória aversiva do animal (Bernabeu et al., 1997).

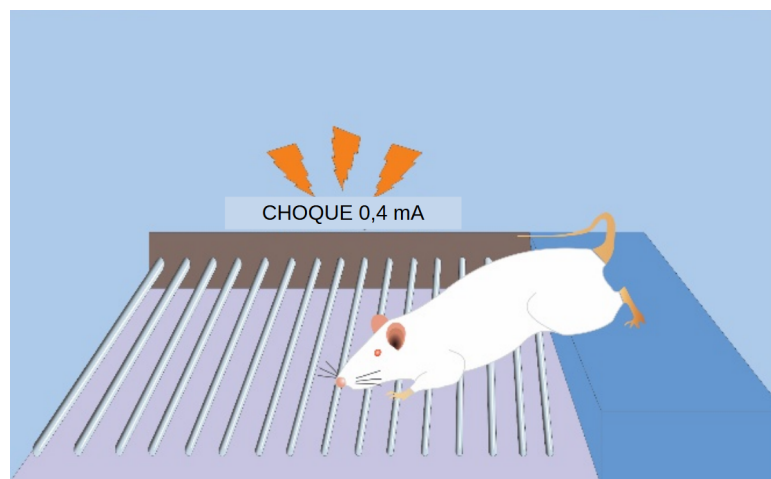


Figura 10 - Teste esquiwa inibitória. Fonte: Generoso, 2017.

3.4. NÍVEIS DE CITOCINAS

As concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram determinadas no hipocampo e córtex pré-frontal, por kits ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em tampão PBS contendo triton 0,1% e inibidor de protease (50 mM - Roche AG, Basileia, Suíça) e, em seguida, centrifugadas (13000 rpm a 4 °C durante 20 min). O sobrenadante foi recolhido e realizou-se a quantificação de proteína pelo kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, EUA). O ensaio de ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e a leitura foi realizada na leitora de microplacas (SPECTRAMAX, Molecular Devices, USA). Os níveis de proteína estão apresentados em pg/mg de proteína total (Lowry et al., 1951).

3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA INTESTINAL

Amostras para histologia (íleo) foram removidas e colocadas em formalina tamponada neutra para fixação e cortes corados com hematoxilina-eosina de 5 microns de espessura foram preparados após inclusão em parafina e processamento histológico. Os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz padrão. As medidas do comprimento das vilosidades intestinais e da profundidade das criptas foram realizadas usando o software NIS Br e feitas a partir de fotomicrografias tiradas com ampliação de 100x em microscópio invertido Nikon Ti-U eclipse (Nikon, Tóquio, Japão) (Giridharan et al., 2022).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Os dados da tarefa de habituação ao campo aberto foram relatados como média \pm EPM, e as comparações dentre os grupos foram feitas utilizando-se o teste *t* de *Student* pareado. Dados do teste de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória foram realizados pelo teste *U-Mann-Whitney*. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de *Wilcoxon*. Para as demais análises, os dados estão apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. Os resultados estatisticamente significativos estão indicados por $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do *software Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

3.7. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os animais foram alojados no Biotério da Universidade em local fresco e arejado onde ficaram mantidos em um ciclo 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com alimento e água sempre disponíveis, mantidos cinco indivíduos por gaiola (medidas: 41 cm x 34 cm x 16 cm) até o final de cada experimento, em que foi realizada a morte por decapitação com guilhotina sob anestesia.

O uso dos animais seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, publicação número 85-23, revisada em 1996) e os Princípios do Colégio de Experimentação Animal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNESC sob o protocolo 73/2022 (Anexo A).

4. RESULTADOS

A figura 11 representa dados do teste de habituação ao campo aberto. Os animais do grupo controle apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos e levantamentos na sessão teste quando comparada à sessão treino ($p < 0.05$), demonstrando que a memória de habituação estava preservada nesses animais. Entretanto, o grupo meningite não apresentou diferença estatística significativa entre as sessões treino e teste em ambos os parâmetros avaliados (cruzamentos e levantamentos) ($p > 0.05$), demonstrando comprometimento da memória de habituação nesse grupo.

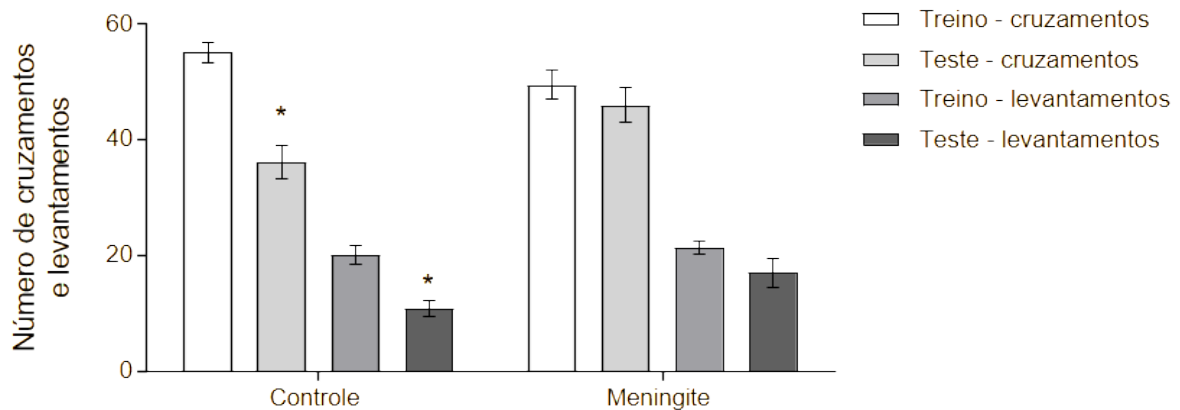


Figura 11. Teste de habituação a campo aberto em ratos Wistar adultos 10 dias após indução de meningite pneumocócica. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 10 animais por grupo e as comparações dentro os grupos realizadas com teste t de *Student* pareado. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste.

No teste de reconhecimento de novos objetivos, figura 12, é possível observar que 24 horas após a sessão treino, os animais do grupo controle utilizaram mais tempo para o reconhecimento do novo objeto na sessão teste, o que indica que esses animais apresentaram memória de longo prazo ($p < 0,05$). Entretanto no grupo meningite não houve diferença no índice de reconhecimento entre as sessões treino e teste, demonstrando mesmo tempo de exploração ao novo objeto e indicando uma redução na memória dos animais.

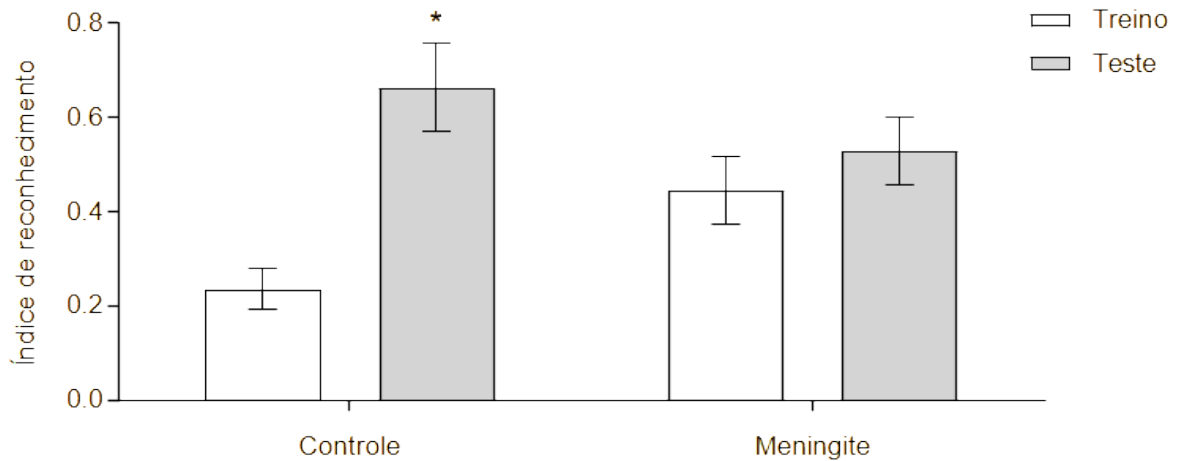


Figura 12. Teste de reconhecimento de novos objetos em ratos Wistar adultos 10 dias após indução de meningite pneumocócica. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U *Mann-Whitney*. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste.

O teste comportamento de esQUIVA inibitória é apresentado na figura 13. Os dados demonstram preservação na memória aversiva dos animais do grupo controle, evidenciada pelo aumento no tempo de permanência no aparato, durante o teste quando comparado ao treino ($p < 0,05$). No grupo meningite não houve diferença no tempo de latência entre a sessão treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva ($p > 0,05$). Isso indica prejuízo na retenção da memória previamente adquirida no treino.

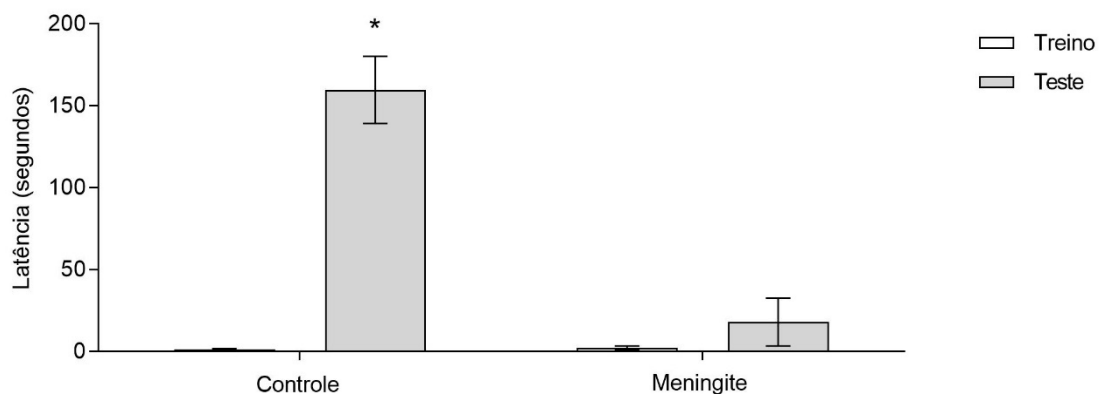
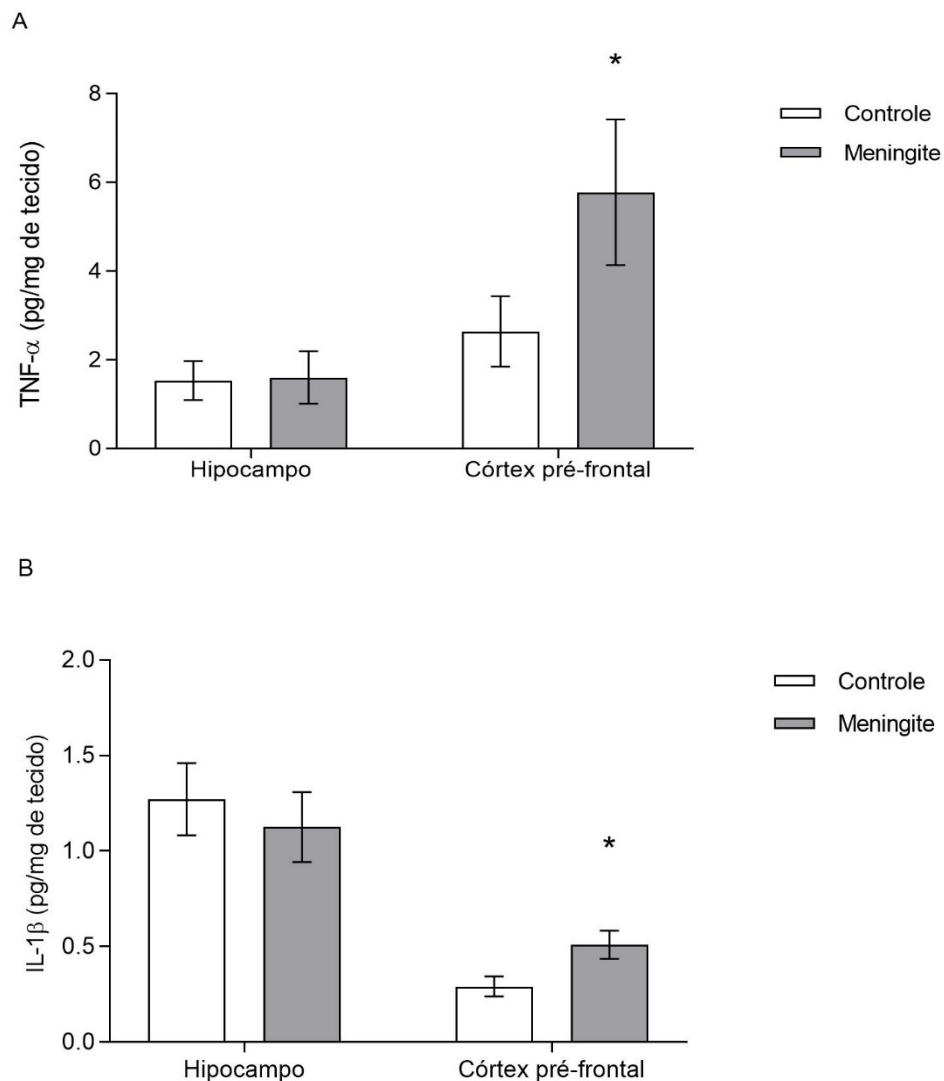


Figura 13. Teste de esQUIVA inibitória 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Dados do teste de esQUIVA inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U *Mann-Whitney*. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado a sessão treino. Fonte: autores.

A figura 14 apresenta os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 nas estruturas cerebrais, hipocampo e córtex pré-frontal, de ratos Wistar adultos após 10 dias da indução da meningite por *S. pneumoniae*. Houve aumento dos níveis TNF- α (A) e IL-1 β (B) no córtex pré-frontal do grupo meningite em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foram observadas alterações dos níveis de citocinas no hipocampo ($p > 0,05$). Além disso, não houve alterações nas dosagens de IL-6 (C) e IL-10 (D) em nenhuma das estruturas analisadas ($p > 0,05$).



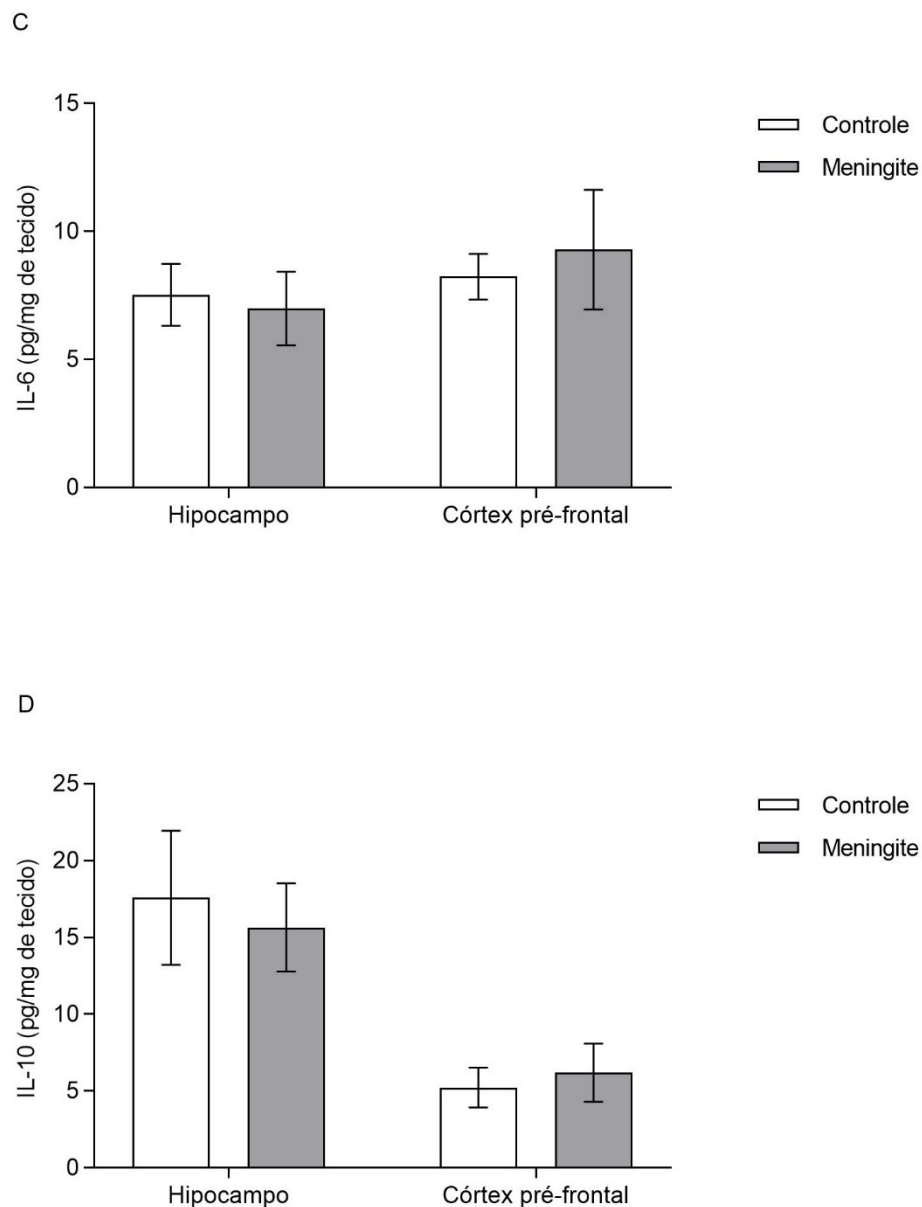
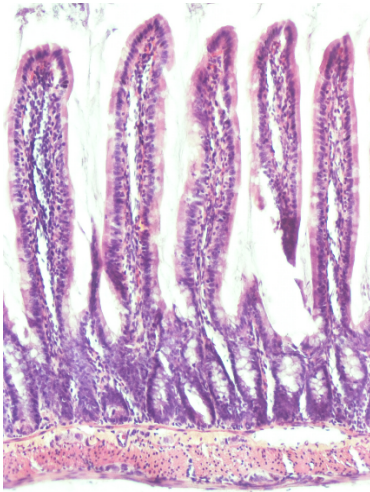


Figura 14. Avaliação dos níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), e IL-10 (D) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após submetidos à meningite pneumocócica. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste *t* de *Student* não pareado. *diferença estatística comparado ao grupo controle. Fonte: autores.

Na figura 15 são apresentadas imagens histológicas intestinais de ratos Wistar adultos após 10 dias da indução da meningite por *S. pneumoniae*. Nas imagens foram avaliados os comprimentos das vilosidades e a profundidade das criptas do íleo (A e B), que se demonstraram diminuídas no grupo meningite em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (C e D), sugerindo alteração intestinal.

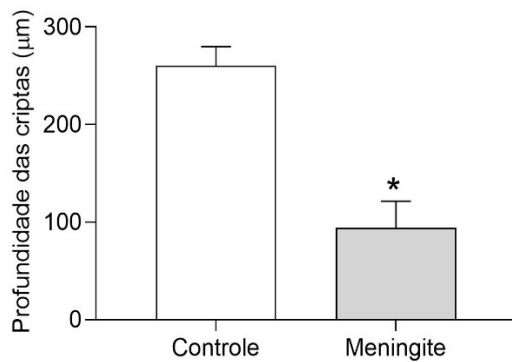
A Controle



B Meningite



C



D

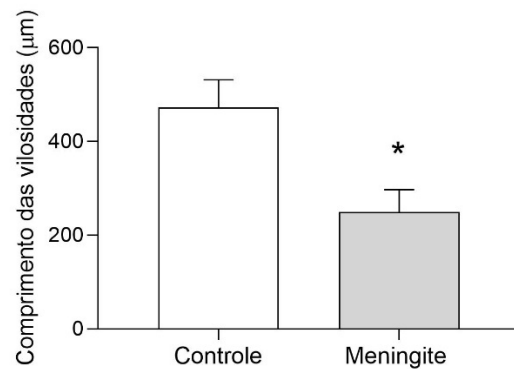


Figura 15. Histologia intestinal com hematoxilina e eosina (A e B), profundidade das criptas (C) e comprimento das vilosidades (D) demonstram que houve diminuição 10 dias após a meningite pneumocócica (barra de escala = 100 µm; ampliação, x 100). Os resultados são expressos como média ± EPM para n=4 ratos. *p < 0,05 indica diferença estatística comparado ao grupo controle. Fonte: autores.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a memória e aprendizagem, os níveis de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL10) no hipocampo e córtex pré-frontal, além da histologia intestinal com caracterização das vilosidades e criptas em modelo animal de meningite bacteriana.

Os animais do grupo meningite apresentaram alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no córtex pré-frontal 10 dias após a infecção. Embora livres de infecção, na avaliação intestinal observou-se dano estrutural significativo nas vilosidades e criptas intestinais dos animais do grupo meningite. Ainda, foram verificados prejuízo de parâmetros comportamentais nas memórias de habituação, aversiva e de reconhecimento, através dos testes de campo aberto, esQUIVA inibitória e reconhecimento de novos objetos, no grupo meningite. Sugere-se ainda que a meningite pode alterar a homeostasia do eixo cérebro-intestino.

O processo fisiopatológico da meningite bacteriana é similar na maioria dos casos, com a colonização de vias aéreas superiores e posterior acometimento da corrente sanguínea, que culmina na migração das cepas ao SNC (Weight et al., 2019, Tuomanen, 2020). Após a colonização, a resposta da defesa imunológica do hospedeiro ao *S. pneumoniae* atua como responsável por gerar danos às estruturas cerebrais, onde o patógeno é imediatamente confrontado e atacado pelo sistema complemento que exacerba a resposta inflamatória (Braun et al., 1999, Ramos-Sevillano et al., 2011). A fisiopatologia do acometimento neuronal está diretamente ligada a resposta inflamatória excessiva dos neutrófilos que tem sido associada ao aumento da lesão do SNC, caracterizada por edema vasogênico pronunciado, vasculite, hemorragias cerebrais e escores clínicos mais altos (Koedel et al., 2009).

Os pneumococos usam diversos fatores de virulência para iniciar a ligação às células endoteliais do cérebro humano e adentrar na BHE, como a neuraminidase A e a adesina do pilus-1 pneumocócico, RrgA, importantes para a conexão com moléculas de adesão celular, como a endotelial plaquetária (PECAM-1) (Herold et al., 2019). Outro fator de virulência do *S. pneumoniae* é a pneumolisina, que desempenha um papel importante na indução da expressão da proteína ligadora de CERB (CBP), um coativador de transcrição, relacionado a liberação de TNF- α e

IL-6, que possui correlação ao aumento da permeabilidade da BHE através da exacerbação da apoptose celular tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Chen et al., 2019).

Ao invadir as meninges, o patógeno induz com rapidez uma inflamação mediada pelo sistema imune inato, presente no LCR, devido a liberação de componentes imunogênicos das bactérias, reconhecidos pelos PRRs (Iovino et al., 2013). Dentre os PRRs mais importantes se destacam os membros da família de receptores do tipo TLR e o NOD2, pertencente à família dos receptores do tipo NOD (NLRs). O TLR2 reconhece a parede celular, lipoproteínas e o ácido lipoteicoico, enquanto o TLR4 detecta a pneumolisina e o TLR9 detecta o DNA bacteriano, liberado durante a autólise (Mook-Kanamori et al., 2011, Koppe, Suttorp, Opitz, 2012).

O sistema imune do SNC torna-se crucial para localizar as cepas e promover a resposta imunológica, por meio da síntese de moléculas pró e anti-inflamatórias. No espaço subaracnóideo, ocorre a liberação de IL-1 β , IL-8, IL-6 e TNF- α , sendo responsáveis exacerbar a resposta imune e gerar mais mediadores inflamatórios (Yekani, Memar, 2023, Pedemonte et al., 2006, Shukla et al., 2022). Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-12, citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e quimiocinas como CXCL8 (IL-8), CCL3 (MIP-1a) e CCL2 (MCP-1) foram descritas no LCR de pacientes acometidos pelo pneumococo (Coutinho et al., 2013).

Em um estudo realizado com modelo experimental agudo de meningite, com ratos Wistar, verificou-se que os níveis de TNF- α se mostraram aumentados após 6 horas de indução, em hipocampo e córtex pré-frontal. No decorrer de 24 horas os níveis de IL-1 β e IL-6 apresentaram-se aumentados no córtex pré-frontal. No hipocampo, não foram identificadas alterações no mesmo intervalo de tempo (Barichello et al., 2010). Na avaliação dos níveis de citocinas 10 dias após a indução, modelo animal similar ao utilizado nesse estudo, evidenciou-se aumento de TNF- α e IL-1 β na região do córtex pré-frontal (Giridharan et al., 2021).

Em um estudo mais recente que avaliou a resposta aguda (24 horas) e tardia (10 dias), os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-18 demonstraram-se aumentados em comparação ao grupo controle em modelo agudo. Ainda, verificou-se que após 10 dias os níveis TNF- α , IL-1 β , e IL-18 permaneceram aumentados no hipocampo e córtex pré-frontal no grupo meningite quando comparado ao grupo controle. Os autores utilizaram um inibidor específico de NLRP3 (MCC950) que

resultou em diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-18 em relação ao grupo meningite. Entretanto, apresentaram níveis elevados de IL-10, demonstrando resposta anti-inflamatória (Generoso et al., 2023). Similarmente aos resultados descritos anteriormente, nesse estudo os níveis de TNF- α e IL-1 β estiveram aumentados após 10 dias do modelo experimental, em região de córtex pré-frontal, sugerindo uma suscetibilidade dessa área. Na avaliação de pacientes de 2 a 6 dias de internação, os níveis de citocinas IL-1 β e IL-18 estavam envolvidos com o progresso de complicações sistêmicas e prognóstico ruim (Geldhoff et al., 2013). Os níveis aumentados dessas citocinas podem correlacionar-se a gravidade da lesão e dano cognitivo de longo prazo (Barichello et al., 2013a, Barichello et al., 2013b).

A manutenção de níveis elevados de TNF- α foram descritos dias após o início do processo infeccioso, demonstrando uma correlação com déficits na função cognitiva e na depressão (Thomas et al., 2005). Da mesma forma que o TNF- α , a IL-1 β atua como importante mediador da resposta inflamatória aguda, e sua ligação aos seus receptores ativa o NF- κ B, crucial para sinalização inflamatória remanescente (Liechti et al., 2015), sendo dependente do inflamassoma NLRP3, que controla a ativação da caspase-1, necessária para a maturação das citocinas IL-1 β e IL-18, aumentando o processo inflamatório (Liu, Mi, Wang, 2013).

A respeito da microbiota intestinal e o funcionamento ideal da função cerebral, existem interações complexas, com vias de mão dupla entre o SNC e o intestino, chamado eixo microbiota-intestino-cérebro, mediado pelo nervo vago e sistema nervoso autônomo (Sharon et al., 2016). O nervo vago é ativado pelas secreções de moléculas sinalizadoras que modulam o sistema imunológico ativando por transdução o cérebro. O ideal funcionamento da micróglia do SNC depende diretamente dos produtos metabólicos do microbioma intestinal saudável (Doifode et al., 2021).

Existem trilhões de microrganismos habitando o interior do corpo humano, no microbioma intestinal. Essa nomenclatura é consideravelmente usada de forma permutável com microbiota, mas a diferença se dá pela inclusão de genes e genomas que se somam ao enigmático ecossistema microbiano (Thomas et al., 2005). Muito além do metabolismo essencial que gera nutrição e digestão, a presença de funções de proteção contra invasões de patógenos, a microbiota intestinal desempenha um papel de trofismo, importantíssimo para crescimento e diferenciação de células epiteliais que regula o equilíbrio correto do sistema

imunológico (Chen, Xu, Chen, 2021). No SNC, a microbiota também é responsável pela sincronização funcional do SNC e pela parte comportamental que liga o sistema intestinal e o cérebro, através da sinalização metabólica, neuronal, imunológica e endócrina (Doifode et al., 2021, Jain, Madkan, Patil, 2023).

Nesse estudo, avaliou-se a estrutura do tecido intestinal através de cortes histológicos com caracterização das vilosidades e criptas intestinais dos animais e observou-se dano significativo do grupo meningite quando comparado ao controle. A arquitetura intestinal é diretamente influenciada pela microbiota local, estando a disbiose fortemente relacionada às modificações na altura dos vilos e profundidade das criptas. No geral, a maior altura dos vilos está associada a uma boa diferenciação e saúde da mucosa intestinal (Jeurissen et al., 2002). Estudos demonstram que a microbiota altera o neurodesenvolvimento do hipocampo (Ogbonnaya et al., 2015). Corroborando com os resultados desse estudo, um modelo animal de sepse que avaliou a permeabilidade intestinal identificou resultados semelhantes, através de uma diminuição no comprimento das vilosidades e profundidade das criptas, diminuição na diversidade e abundância da microbiota e uma redução nos metabólitos primários dos AGCC produzidos pela microbiota, sugerindo fortemente uma disbiose intestinal (Giridharan et al., 2022).

O microbioma intestinal e os AGCCs estão intimamente associados à neuroinflamação em pacientes com encefalopatia associada à sepse (EAS), bem como imunidade, função da BHE e metabolismo energético (Wu et al., 2021), e alterações nos componentes dos AGCC via administração direta ou intervenções dietéticas podem ser uma abordagem promissora futura (Zhang et al., 2023). Em modelo animal de EAS foi verificado que camundongos apresentaram níveis mais baixos de AGCC, especialmente acetato e propionato, houve ainda uma diminuição significativa de bactérias produtoras desses metabólitos, incluindo *Allobaculum*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. Após a administração de AGCC, observou-se que o efeito neuroprotetor deste contribuiu para a recuperação cognitiva em camundongos (Liao et al., 2022).

Estudos experimentais em modelos animais têm apoiado ainda mais a função dos micróbios intestinais em condições neurológicas em que camundongos livres de patógenos, comparados com criados tradicionalmente, apresentam neuroinflamação reduzida e função cognitiva melhorada (Roy Sarkar, Banerjee, 2019). Em modelo animal de doença de Parkinson foram identificadas alterações

histológicas intestinais substanciais, como encurtamento das vilosidades, perda da arquitetura das criptas e inflamação, demonstrando que a doença pode ser influenciada por alterações no eixo intestino-cérebro (Dos Santos et al., 2023), assim como um modelo animal de acidente vascular cerebral (AVC), que identificou que o microbioma intestinal afeta o desfecho e a recuperação pós-AVC, demonstrando um impacto negativo nos animais livres de germes quando comparados aos camundongos controle (Singh et al., 2016).

A disbiose intestinal demonstra ser uma causa significativa em inúmeras doenças gastrointestinais e seu papel imunológico correlaciona-se ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, monócitos, lipopolissacarídeos e células T auxiliares, promovendo a permeabilidade da BHE e intestinal (Jain, Madkan, Patil, 2023). Alterações nesse eixo já foram evidenciadas em distúrbios neuropsiquiátricos como doença de Alzheimer, depressão, transtorno do espectro do autismo (TEA), doença de Parkinson e AVC, oriundas de mudanças na composição da microbiota intestinal (Doifode et al., 2021, Jain, Madkan, Patil, 2023). Em resumo, o desequilíbrio da microbiota intestinal altera a homeostase do sistema imunológico periférico e da imunidade cerebral (Ma et al., 2019).

No presente estudo também foi relatado alterações comportamentais e de memórias aversiva e longo prazo e na atividade locomotora quando relacionado ao grupo controle. Corroborando com esses resultados, um estudo recente que avaliou o uso de um inibidor específico de NLRP3, em modelo animal de meningite pneumocócica, identificou que após 10 dias da indução os animais do grupo meningite apresentaram memória de habituação e reconhecimento de novos objetos prejudicados, e o uso do inibidor reverteu esses parâmetros (Generoso et al., 2023). Outro estudo dos mesmos autores identificou danos de memória de habituação, reconhecimento de novos objetos e memória aversiva após modelo de meningite, e o uso de antagonista do receptor de IL-1 β preveniu o comprometimento de memória (Barichello et al., 2015).

Pacientes adultos com infecção meningea pelo *S. pneumoniae*, possuem risco aumentado de desenvolvimento de déficits neurológicos e neuropsicológicos a longo prazo, causando prejuízo na qualidade de vida e afazeres diários (Kloek et al., 2020). O aumento de citocinas pró-inflamatórias, como evidenciado neste estudo, são responsáveis por ocasionar efeitos cerebrais importantes na fase aguda, como as sequelas neurofuncionais resultantes de apoptose neuronal. As funções

comprometidas incluem funções cognitivas diversas, como audição e aprendizado, além de disfunções motoras (Mook-Kanamori et al., 2011, Braun et al., 1999).

As respostas inflamatórias desreguladas do hospedeiro resultam em dois eventos catastróficos primários, com aumento do estresse oxidativo e tempestade de citocinas, ligados a lesões e danos celulares, e a quebra da BHE que desencadeia ainda mais danos cerebrais de longa duração (Yau et al., 2018). Na meningite pneumocócica experimental, os níveis agudos de IL-1 β se correlacionam com a incidência de sequelas neurológicas (Barichello et al., 2015), e o dano neuronal no hipocampo correlaciona-se positivamente com dificuldades de aprendizagem e déficits cognitivos em sobreviventes de meningite em humanos e modelo animal (Hofer et al., 2011). Níveis aumentados de IL-1 β e IL-18, associados ao aumento da função do inflamassoma de NLRP3, no LCR de pacientes estão correlacionados com complicações sistêmicas e piores resultados clínicos em pacientes (Mustafa et al., 1989).

A meningite pneumocócica, especificamente, leva a comprometimento cognitivo em 30 a 52% dos sobreviventes, incluindo dificuldades no aprendizado, declínio cognitivo, prejuízos na memória de curta duração e baixo desempenho acadêmico (Schiess et al., 2021). Os danos estruturais cerebrais podem resultar de vasoespasmos e redução do fluxo sanguíneo ocasionando necrose cortical, morte celular apoptótica no giro denteado hipocampal, importante região relacionada a memória, lesão axonal isquêmica difusa no cérebro e degeneração Walleriana (Le et al., 2020).

Mesmo significativa, a parcela dos pacientes com sequelas neurocognitivas e alterações comportamentais tende a ser subdiagnosticada (Chandran et al., 2011). Isto se dá, possivelmente, pela sutileza das manifestações, dificuldade no acesso a serviços de saúde e falta de correlação entre as queixas crônicas com o episódio infeccioso prévio (Edmond et al., 2010). Apesar de obtenção clínica evidenciada pela ausência de sintomas, até um terço dos pacientes pode apresentar alteração cognitiva que pode ser evidenciada como, prejuízos de memória, dificuldade de aprendizado, deficiências neuropsiquiátricas, retardo mental, entre outras, levando a uma má qualidade de vida (Kloek et al., 2020).

Atualmente a utilização de estratégias mais eficientes para os clínicos abordarem as infecções pneumocócicas se tornam essenciais, como o acesso imediato aos cuidados, o diagnóstico preciso, a rápida administração de antibióticos

e a prevenção da doença, através da implementação da vacinação generalizada contra o pneumococo. Além disso técnicas diagnósticas aprimoradas e tratamentos mais eficazes podem ajudar a reduzir a carga da doença pneumocócica, reduzindo sequelas e evitando a mortalidade (Ludwig et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou a relação entre os parâmetros inflamatórios cerebrais e o dano das estruturas intestinais, associados a disfunção cognitiva após a meningite pneumocócica experimental. A pesquisa demonstrou aumento dos níveis de concentração de citocinas IL-1 β e TNF- α do córtex pré-frontal e diminuição das vilosidades e criptas intestinais de ratos 10 dias após a infecção por *S. pneumoniae*. Além disso, quando analisados os testes comportamentais, observou-se que a longo prazo essa interação pode se relacionar a danos cognitivo e de memória. Apesar de parciais, esses resultados sugerem que as alterações estruturais do intestino podem estar relacionadas à meningite bacteriana. Também permitem aventar a possibilidade de, junto às alterações histológicas, encontrarmos mudança na microbiota intestinal e ruptura do equilíbrio do eixo microbiota-intestino-cérebro. Novos estudos que correlacionem possíveis alterações na microbiota intestinal à meningite bacteriana podem trazer à luz um mecanismo adicional à patogênese do dano cognitivo tão presente no pós-meningite.

REFERÊNCIAS

Acevedo R, Bai X, Borrow R, Caugant DA, Carlos J, Ceyhan M, Christensen H, Climent Y, De Wals P, Dinleyici EC, Echaniz-Aviles G, Hakawi A, Kamiya H, Karachaliou A, Lucidarme J, Meiring S, Mironov K, Sáfadi MaP, Shao Z, Smith V, Steffen R, Stenmark B, Taha MK, Trotter C, Vázquez JA, Zhu B. The Global Meningococcal Initiative meeting on prevention of meningococcal disease worldwide: Epidemiology, surveillance, hypervirulent strains, antibiotic resistance and high-risk populations. *Expert Rev Vaccines*. 2019;18(1):15-30.

Baker RC, Kummer AW, Schultz JR, Ho M, Gonzalez Del Rey J. Neurodevelopmental outcome of infants with viral meningitis in the first three months of life. *Clin Pediatr (Phila)*. 1996;35(6):295-301.

Barichello T, Ceretta RA, Generoso JS, Moreira AP, Simoes LR, Comim CM, Quevedo J, Vilela MC, Zuardi AW, Crippa JA, Teixeira AL. Cannabidiol reduces host immune response and prevents cognitive impairments in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. *Eur J Pharmacol*. 2012;697(1-3):158-64.

Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simões LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol*. 2010 Apr 15;221(1-2):42-5.

Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simões LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol*. 2010 Apr 15;221(1-2):42-5.

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

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

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

Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(13):7041-6.

Bijlsma MW, Brouwer MC, Kasanmoentalib ES, Kloek AT, Lucas MJ, Tanck MW, Van Der Ende A, Van De Beek D. Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006-14: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):339-47.

Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull.* 2010;57(1):B4119.

Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):298-302.

Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med.* 1999 Mar;5(3):298-302.

Chandran A, Herbert H, Misurski D, Santosham M. Long-term sequelae of childhood bacterial meningitis: an underappreciated problem. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1):3-6.

Chang L, Wei Y, Hashimoto K. Brain-gut-microbiota axis in depression: A historical overview and future directions. *Brain Res Bull.* 2022;18244-56.

Chen JQ, Li NN, Wang BW, Liu XF, Liu JL, Chang Q. Upregulation of CBP by PLY can cause permeability of blood-brain barrier to increase meningitis. *J Biochem Mol Toxicol.* 2019 Jul;33(7):e22333.

Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3391-6.

Chen Y, Xu J, Chen Y. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients.* 2021 Jun 19;13(6):2099.

Christie D, Rashid H, El-Bashir H, Sweeney F, Shore T, Booy R, Viner RM. Impact of meningitis on intelligence and development: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(8):e0175024.

Codagnone MG, Spichak S, O'mahony SM, O'leary OF, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Programming Bugs: Microbiota and the Developmental Origins of Brain Health and Disease. *Biol Psychiatry.* 2019;85(2):150-63.

Costerus JM, Brouwer MC, Bijlsma MW, Van De Beek D. Community-acquired bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(1):135-41.

Coutinho LG, Grandgirard D, Leib SL, Agnez-Lima LF. Cerebrospinal-fluid cytokine and chemokine profile in patients with pneumococcal and meningococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2013;13:326.

Cryan JF, O'riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cusotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-

Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, Van De Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev.* 2019;99(4):1877-2013.

De Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res.* 2005;156(1):139-43.

Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/171748>

Doifode T, Giridharan VV, Generoso JS, Bhatti G, Collodel A, Schulz PE, Forlenza OV, Barichello T. The impact of the microbiota-gut-brain axis on Alzheimer's disease pathophysiology. *Pharmacol Res.* 2021;164105314.

Dokalis N, Prinz M. Resolution of neuroinflammation: mechanisms and potential therapeutic option. *Semin Immunopathol.* 2019;41(6):699-709.

Dos Santos JCC, Rebouças CDSM, Oliveira LF, Cardoso FDS, Nascimento TS, Oliveira AV, Lima MPP, de Andrade GM, de Castro Brito GA, de Barros Viana GS. The role of gut-brain axis in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2023 Dec;132:185-197.

Douglas GM, Bielawski JP, Langille MGI. Re-evaluating the relationship between missing heritability and the microbiome. *Microbiome.* 2020;8(1):87.

Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(5):317-28.

Ellis J, Luintel A, Chandna A, Heyderman RS. Community-acquired acute bacterial meningitis in adults: a clinical update. *Br Med Bull.* 2019;131(1):57-70.

Engelen-Lee JY, Brouwer MC, Aronica E, Van De Beek D. Pneumococcal meningitis: clinical-pathological correlations (MeninGene-Path). *Acta Neuropathol Commun.* 2016;426.

Fitzgerald D, Waterer GW. Invasive Pneumococcal and Meningococcal Disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):1125-41.

Geldhoff M, Mook-Kanamori BB, Brouwer MC, Troost D, Leemans JC, Flavell RA, Van der Ende A, Van der Poll T, Van de Beek D. Inflammasome activation mediates inflammation and outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis.* 2013 Jul 31;13:358.

Generoso JS, Faller CJ, Collodel A, Catalão CHR, Domingui D, Petronilho F, Barichello T, Giridharan VV. NLRP3 Activation Contributes to Memory Impairment in an Experimental Model of Pneumococcal Meningitis. *Mol Neurobiol.* 2023 Aug 21. doi: 10.1007/s12035-023-03549-8.

Generoso JS, Giridharan VV, Lee J, Macedo D, Barichello T. The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. *Braz J Psychiatry*. 2021;43(3):293-305.

Giridharan VV, Generoso JS, Collodel A, Dominguni D, Faller CJ, Tardin F, Bhatti GS, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Barichello T. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Mediates Cognitive Impairment Triggered by Pneumococcal Meningitis. *Neurotherapeutics*. 2021;18(1):640-53.

Giridharan VV, Generoso JS, Lence L, Candiotta G, Streck E, Petronilho F, Pillai A, Sharshar T, Dal-Pizzol F, Barichello T. A crosstalk between gut and brain in sepsis-induced cognitive decline. *J Neuroinflammation*. 2022 May 23;19(1):114.

Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child*. 2000;83(2):111-6.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512-9.

Gutierrez-Vazquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*. 2018;48(1):19-33.

Hasbun R. Progress and Challenges in Bacterial Meningitis: A Review. *JAMA*. 2022;328(21):2147-54.

Hasbun R. Update and advances in community acquired bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(3):233-8.

Heckenberg SG, Brouwer MC, Van De Beek D. Bacterial meningitis. *Handb Clin Neurol*. 2014;121:1361-75.

Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(7):

Herold R, Schrotten H, Schwerk C. Virulence Factors of Meningitis-Causing Bacteria: Enabling Brain Entry across the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 29;20(21):5393.

Hofer S, Grandgirard D, Burri D, Fröhlich TK, Leib SL. Bacterial meningitis impairs hippocampal neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(10):890-899.

Honarpisheh P, Bryan RM, Mccullough LD. Aging Microbiota-Gut-Brain Axis in Stroke Risk and Outcome. *Circ Res*. 2022;130(8):1112-44.

Iovino F, Orihuela CJ, Moorlag HE, Molema G, Bijlsma JJ. Interactions between blood-borne *Streptococcus pneumoniae* and the blood-brain barrier preceding meningitis. *PLoS One*. 2013;8(7):e68408.

Jain A, Madkan S, Patil P. The Role of Gut Microbiota in Neurodegenerative Diseases: Current Insights and Therapeutic Implications. *Cureus*. 2023 Oct 28;15(10):e47861.

Jeurissen SH, Lewis F, van der Klis JD, Mroz Z, Rebel JM, ter Huurne AA. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2002;3(1):1-14.

Kadioglu A, Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol*. 2004;25(3):143-149.

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

Kloek AT, Brouwer MC, Schmand B, Tanck MWT, Van De Beek D. Long-term neurologic and cognitive outcome and quality of life in adults after pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Infect*. 2020;30(20):30045-8.

Koedel U, Bayerlein I, Paul R, Sporer B, Pfister HW. Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 2000;182(5):1437-45.

Koedel U, Frankenberg T, Kirschnek S, Obermaier B, Häcker H, Paul R, Häcker G. Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog*. 2009 May;5(5):e1000461

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

Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-45.

Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012;14:460 - 466.

Kumar S, Ingle H, Prasad DV, Kumar H. Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(3):229-46.

Le ND, Muri L, Grandgirard D, Kuhle J, Leppert D, Leib SL. Evaluation of neurofilament light chain in the cerebrospinal fluid and blood as a biomarker for neuronal damage in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation*. 2020 Oct 7;17(1):293.

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647-51.

Liao H, Li H, Bao H, Jiang L, Du J, Guo Y, Si Y. Short Chain Fatty Acids Protect the Cognitive Function of Sepsis Associated Encephalopathy Mice via GPR43. *Front Neurol*. 2022 Jun 10;13:909436.

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

Li-Korotky HS, Banks JM, Lo CY, Zeng FR, Stolz DB, Swarts JD, Doyle WJ. Interaction of pneumococcal phase variation and middle ear pressure/gas composition: an in vitro model of simulated otitis media. *Microb Pathog*. 2008;45(3):201-6.

Liu SB, Mi WL, Wang YQ. Research progress on the NLRP3 inflammasome and its role in the central nervous system. *Neurosci Bull*. 2013;29(6):779-787.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Lucas MJ, Brouwer MC, Van De Beek D. Neurological sequelae of bacterial meningitis. *J Infect*. 2016;73(1):18-27.

Ludwig E, Bonanni P, Rohde G, Sayiner A, Torres A. The remaining challenges of pneumococcal disease in adults. *Eur Respir Rev*. 2012 Mar 1;21(123):57-65.

Ma Q, Xing C, Long W, Wang HY, Liu Q, Wang RF. Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):53.

Margolis KG, Cryan JF, Mayer EA. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology*. 2021;160(5):1486-501.

Mcgill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T. Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet*. 2016;2(16):30654-7.

Mcintyre PB, O'brien KL, Greenwood B, Van De Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet*. 2012;380(9854):1703-11.

Mogensen J, Moustgaard A, Khan U, Wörtwein G, Nielsen KS. Egocentric spatial orientation in a water maze by rats subjected to transection of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. *Brain Res Bull*. 2005;65(1):41-58.

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

Moreillon P, Majcherczyk PA. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):632-41.

Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016;7(3):189-200.

Murray PR.; Rosenthal, KS.; Pfaller, MA. Microbiologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro (RJ): ELSEVIER, 2014.

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

Ogbonnaya ES, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, O'leary OF. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. *Biol Psychiatry.* 2015;78(4):e7-9.

Orihuela CJ, Mahdavi J, Thornton J, Mann B, Wooldridge KG, Abouseada N, Oldfield NJ, Self T, Ala'aldeen DA, Tuomanen EI. Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1638-46.

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do?. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:104.

Pancholi V, Fontan P, Jin H. Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microb Pathog.* 2003;35(6):293-303.

Pedemonte E, Mancardi G, Giunti D, Corcione A, Benvenuto F, Pistoia V, Uccelli A. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. *Pharmacol Ther.* 2006 Sep;111(3):555-66.

Radin JN, Orihuela CJ, Murti G, Guglielmo C, Murray PJ, Tuomanen EI. beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2005;73(12):7827-35.

Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 2011;6(8):e23626.

Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, Chao CC, Patel B, Yan R, Blain M, Alvarez JI, Kebir H, Anandasabapathy N, Izquierdo G, Jung S, Obholzer N, Pochet N, Clish CB, Prinz M, Prat A, Antel J, Quintana FJ. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med.* 2016;22(6):586-97.

Roy Sarkar S, Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol.* 2019;328:98-104.

Schiess N, Groce NE, Dua T. The Impact and Burden of Neurological Sequelae Following Bacterial Meningitis: A Narrative Review. *Microorganisms.* 2021;9(5):

Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*. 2016;167(4):915-932.

Shukla R, Kalita J, Haldar R, Misra UK. Blood-CSF-barrier permeability in tuberculous meningitis and its association with clinical, MRI and inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol*. 2022 Nov 15;372:577954.

Sigfrid L, Perfect C, Rojek A, Longuere KS, Lipworth S, Harriss E, Lee J, Salam A, Carson G, Goossens H, Horby P. A systematic review of clinical guidelines on the management of acute, community-acquired CNS infections. *BMC Med*. 2019;17(1):170.

Silva AFT da, Valente F de S, Sousa LD de, Cardoso PNM, Silva MA da, Santos DR dos. Estudo epidemiológico sobre meningite bacteriana no Brasil no período entre 2009 a 2018. *Rev. Med. (São Paulo)* [Internet]. 2 de agosto de 2021;100(3):220-8.

Sinan SDIDaDN-. Meningite. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/meningite>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2022.

Singh V, Roth S, Llovera G, et al. Microbiota Dysbiosis Controls the Neuroinflammatory Response after Stroke. *J Neurosci*. 2016;36(28):7428-7440.

Slyepchenko A, Maes M, Jacka FN, Köhler CA, Barichello T, McIntyre RS, Berk M, Grande I, Foster JA, Vieta E, Carvalho AF. Gut Microbiota, Bacterial Translocation, and Interactions with Diet: Pathophysiological Links between Major Depressive Disorder and Non-Communicable Medical Comorbidities. *Psychother Psychosom*. 2017;86(1):31-46.

Somand D, Meurer W. Central nervous system infections. *Emerg Med Clin North Am*. 2009;27(1):89-100.

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

Thomas AJ, Davis S, Morris C, Jackson E, Harrison R, O'Brien JT. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am J Psychiatry*. 2005 Jan;162(1):175-7.

Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-36.

Tuomanen EI. Perspective of a Pediatrician: Shared Pathogenesis of the Three Most Successful Pathogens of Children. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Oct 15;10:585791.

Van De Beek D, Brouwer M, Hasbun R, Koedel U, Whitney CG, Wijdicks E. Community-acquired bacterial meningitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;216074.

Van De Beek D, Brouwer MC, Koedel U, Wall EC. Community-acquired bacterial meningitis. *Lancet*. 2021;398(10306):1171-83.

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

Weight CM, Venturini C, Pojar S, Jochems SP, Reiné J, Nikolaou E, Solórzano C, Noursadeghi M, Brown JS, Ferreira DM, Heyderman RS. Microinvasion by *Streptococcus pneumoniae* induces epithelial innate immunity during colonisation at the human mucosal surface. *Nat Commun*. 2019 Jul 16;10(1):3060.

Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure HR. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun*. 1994;62(6):2582-9.

Weisfelt M, Van De Beek D, Spanjaard L, Reitsma JB, De Gans J. Clinical features, complications, and outcome in adults with pneumococcal meningitis: a prospective case series. *Lancet Neurol*. 2006;5(2):123-9.

Wu L, Han Y, Zheng Z, Peng G, Liu P, Yue S, Zhu S, Chen J, Lv H, Shao L, Sheng Y, Wang Y, Li L, Li L, Wang B. Altered Gut Microbial Metabolites in Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Signals in Host-Microbe Interplay. *Nutrients*. 2021 Jan 14;13(1):228.

Yau B, Hunt NH, Mitchell AJ, Too LK. Blood–Brain Barrier Pathology and CNS Outcomes in *Streptococcus pneumoniae* Meningitis. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 11;19(11):3555.

Yekani M, Memar MY. Immunologic biomarkers for bacterial meningitis. *Clin Chim Acta*. 2023 Aug 1;548:117470. doi: 10.1016/j.cca.2023.117470.

Zelano J, Westman G. Epilepsy after brain infection in adults: A register-based population-wide study. *Neurology*. 2020;95(24):e3213-e20.

Zhang Q, Lu C, Fan W, Zhang J, Yin Y. Application background and mechanism of short-chain fatty acids in sepsis-associated encephalopathy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Mar 28;13:1137161.

Zhao G, Nyman M, Jönsson JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(8):674-82.

ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação da Comissão de Ética em Uso de animais da UNESC



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 14/03/2023.

Título do projeto	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.
Project title	Evaluation of the functionality of the glymphatic system and mechanisms of long-term cognitive dysfunction in an experimental model of pneumococcal meningitis or sepsis.
Número do protocolo Protocol number	73/2022 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Jaqueline da Silva Generoso
Pesquisadores Researchers	Igor Pereira Bilelmo, Cristiano Julio Faller, Beatriz Brandão Lima, Beatriz Ramos Maccari, Ellana Marcon Cadorn, Ingridy da Paz Bauer, Nicole Golombleski Duarte, Pedro Mendes Maciel, Jéssica Zilli Nunes, Isadora de Bittencourt Benedet, Julia Torcelli Noetzold, Diogo Dominguil, Lucnêla Galnski Danielecki, Tatiana Barichello, Fabricia Petronilho, Samuel Brasil Stonoga, João Victor Vicente Costa, Eloa Melpomene Piva Uchida, Amanda Christine da Silva Kursancew.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/11/2022 a 03/11/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250 – 300g
Número de animais	Masculino 188
Procedência	Biotério UNESC

Obs.: As alterações no presente projeto serão apenas para inclusão de membros colaboradores e técnicas (quantificação de ácidos graxos de cadeia curta e histologia intestinal).

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.

Josiane Budni
Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 14 de março de 2023