

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Pesquisa de biomarcadores e alvos terapêuticos para as meningites por meio
da proteômica comparativa do líquido de pacientes**

**por
Ana Paula Cordeiro**

**Belo Horizonte
Julho/2013**

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Pesquisa de biomarcadores e alvos terapêuticos para as meningites por meio
da proteômica comparativa do líquido de pacientes**

**por
Ana Paula Cordeiro**

**Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração em Biologia
Celular e Molecular.**

**Orientação: Roney Santos Coimbra
Co-orientação: Rosiane Aparecida
da Silva Pereira**

**Belo Horizonte
Julho/ 2013**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C794p	Cordeiro, Ana Paula.
2013	Pesquisa de biomarcadores e alvos terapêuticos para as meningites por meio da proteômica comparativa do líquido de pacientes / Ana Paula Cordeiro. – Belo Horizonte, 2013. XXVI, 164 f.: il.; 210 x 297 mm. Bibliografia: f.174 – 190. Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. 1. Meningite/microbiologia 2. Proteoma/uso terapêutico 3. Líquido Cefalorraquidiano/microbiologia I. Título. II. Coimbra, Roney Santos (Orientação). III. Pereira, Rosiane A. Silva (Co-orientação). CDD – 22. ed. – 616.82

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Pesquisa de biomarcadores e alvos terapêuticos para as meningites por meio
da proteômica comparativa do líquido de pacientes**

**por
Ana Paula Cordeiro**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:
Prof. Dr. Roney Santos Coimbra (Presidente)
Prof. Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho
Prof. Dr. Luiz Augusto Pinto
Suplente: Prof. Dr. Jerônimo Conceição Ruiz**

Dissertação defendida e aprovada em: 01/07/2013

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãs por tanto carinho, pela compreensão, constante incentivo e por me proporcionarem tantos momentos de felicidade.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer

Ao meu orientador Dr. Roney Santos Coimbra, pela oportunidade de participar deste projeto, pelo seu fundamental papel no meu crescimento pessoal e profissional, por acreditar na minha capacidade, por me estimular a exercer o método científico e o pensamento crítico, pelo tempo dedicado, paciência e compreensão, pelo estímulo diário ao meu desenvolvimento cultural e por ser um modelo de cientista que ficará como exemplo na minha vida.

À minha co-orientadora Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira, por ter contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional, pelo ensinamento científico, pelo apoio incondicional, por estar sempre disponível para esclarecimentos e por ser um modelo de profissional científico que ficará como exemplo na minha vida.

Especialmente à Clarice Semião Coimbra, que padronizou a metodologia de 2D-PAGE do líquor no CPqRR e realizou os experimentos de prova de conceito que demonstraram a viabilidade deste projeto. Além disso, por ter iniciado meu conhecimento em proteômica e pela dedicação para me treinar e demonstrar o rigor científico na execução do trabalho.

Aos Drs. Jonas Perales e Alexander Chapearouge pelo apoio técnico e científico na realização de técnicas essenciais à conclusão desse trabalho.

Às plataformas tecnológicas de Eletroforese 2D – BH e Espectrometria de Massas – RJ por colaborarem com a realização de técnicas fundamentais para este trabalho.

À Talitah Michel Sanchez Candiani e à Flávia Alves Campos representando a equipe do Hospital João Paulo II – FHEMIG pelas amostras fornecidas para este projeto.

À equipe do Hospital Giselda Trigueiro – Natal, pelas amostras fornecidas para este projeto.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do CPqRR, pesquisadores, funcionários e estudantes. Obrigada pelo apoio e suporte que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Em especial,

Ao Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira, chefe do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, por permitir que este projeto fosse desenvolvido nas dependências do laboratório.

À Dra. Ângela Volpini pelo apoio, pelos conselhos em momentos difíceis durante o desenvolvimento do trabalho, pelas risadas, pelo carinho e pela confiança.

À Dra. Laila Nahum pelos ensinamentos, pelas sábias palavras nos momentos de maior dificuldade, por ser meu guru espiritual, por direcionar meu caminho profissional, por me apoiar incondicionalmente, pelos momentos de emoção e/ou descontração nas conversas no corredor do laboratório, por ser um dos maiores exemplos profissionais da minha vida. Laila, obrigada por tudo!

Ao meu querido amigo, Filipe Augusto Teixeira, pelo apoio incondicional, pelos momentos de descontração, pelo auxílio em diversas etapas desse projeto, por ser amigo, confidente e, sobretudo, pelo aprendizado que contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada.

À Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener, representadas pelo Segemar e Núzia, por todo apoio que foi primordial para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Vânia D' Almeida e todos os amigos do laboratório de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP por terem me recebido com muito carinho e pelos ensinamentos científicos alcançados.

Aos meus grandes amigos que me apoiaram para a conclusão deste trabalho,

À minha família. Aos meus queridos pais, Emília e João, pelo amor incondicional, por me apoiarem durante as madrugadas de conclusão desse trabalho, pelo carinho, por serem os maiores exemplos de ética, amor, solidariedade, companheirismo e dedicação. Às minhas queridas irmãs, Leniane e Luciene, pelo apoio, amor, momentos de descontração, puxadas de orelha, por me ensinarem a seguir em frente para a conclusão dos meus objetivos. Aos meus cunhados, Fábio e Júnior, pelo apoio, confiança e momentos de descontração! Muito obrigada a todos, amo vocês!

Em especial ao meu grande amigo e confidente, Carlos Eduardo Santos Olegário, por ter feito o sonho distante de ingressar no meio acadêmico uma realidade. Muito obrigada por ser um dos meus maiores defensores na vida pessoal e profissional! Pela dedicação e confiança! Amo muito você!

Agradeço ao Centro de Pesquisas René Rachou pelos recursos financeiros que proporcionaram o desenvolvimento deste projeto.

Ao CNPq (Processo nº: 474602/2009-5) pelo financiamento deste projeto.

Ao NIH (Processo FUNDEP nº: 17583) e a CAPES pelas bolsas de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVIII
RESUMO.....	XXV
ABSTRACT.....	XXVI
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 MICROBIOLOGIA E PATOFISIOLOGIA DAS MENINGITES.....	27
1.1.1 MICROBIOLOGIA DAS MENINGITES BACTERIANAS.....	27
1.1.1.1 <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	29
1.1.1.2 <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	28
1.1.1.3 <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	29
1.1.2 PATOFISIOLOGIA DAS MENINGITES BACTERIANAS.....	30
1.1.2.1 COLONIZAÇÃO	30
1.1.2.2 SOBREVIVÊNCIA NA CORRENTE SANGUÍNEA	31
1.1.2.3 INVASÃO BACTERIANA E RESPOSTA IMUNE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	31
1.1.2.4 DANO NEURONAL	33
1.1.3 MENINGITES VIRAIS	35
1.1.3.1 FAMÍLIA <i>PICORNAVIRIDAE</i>	35
1.1.3.1.1 <i>ENTEROVIRUS</i>	35
1.1.3.2 FAMÍLIA <i>HERPESVIRIDAE</i>	35
1.1.3.2.1 <i>HERPES SIMPLEX</i>	36
1.1.3.2.2 <i>VARICELLA ZOSTER</i>	36

1.1.3.3 FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i>	36
1.1.3.3.1 VÍRUS DO OESTE DO NILO.....	37
1.1.4 PATOFISIOLOGIA DAS MENINGITES VIRAIS	37
1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS MENINGITES NO BRASIL E NO MUNDO	39
1.2.1 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA ATUAL DAS MENINGITES BACTERIANAS	39
1.2.2 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA ATUAL DAS MENINGITES VIRAIS	42
1.3 MÉTODOS ATUAIS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS MENINGITES	44
1.3.1 SINAIS CLÍNICOS DA MENINGITE BACTERIANA	44
1.3.2 SINAIS CLÍNICOS DA MENINGITE VIRAL	45
1.3.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	45
1.3.3.1 PARÂMETROS CITOQUÍMICOS DO LÍQUOR.....	45
1.3.3.2 IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO CAUSADOR DE MENINGITE	47
1.4 ESTADO DA ARTE DA PESQUISA DE NOVOS BIOMARCADORES PARA AS MENINGITES	49
1.5 ESQUEMAS TERAPÊUTICOS PARA AS MENINGITES.....	52
1.5.1 MENINGITES BACTERIANAS	52
1.5.2 MENINGITES VIRAIS	54
1.6 A UTILIZAÇÃO DA ABORDAGEM PROTEÔMICA PARA A PESQUISA DE BIOMARCADORES E DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS	55
2 JUSTIFICATIVA.....	57
3 OBJETIVOS.....	59
3.1 OBJETIVO GERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	60

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO SELECIONADA PARA O ESTUDO PROTEÔMICO COMPARATIVO	60
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LÍQUOR	64
4.2.1 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	64
4.2.2 DEPLEÇÃO DE ALBUMINA E IGG DO LÍQUOR DE PACIENTES COM MENINGITE E CONTROLES	64
4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	65
4.2.4 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	66
4.2.4.1 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL – SDS-PAGE	66
4.2.4.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)	67
4.2.4.2.1 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (PRIMEIRA DIMENSÃO)	67
4.2.4.2.2 EQUILÍBRIO DAS FITAS DE IPG	68
4.2.4.2.3 SDS-PAGE (SEGUNDA DIMENSÃO)	68
4.2.5 COLORAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA	69
4.2.5.1 IMPREGNAÇÃO POR NITRATO DE PRATA	69
4.2.5.2 COLORAÇÃO POR AZUL DE COOMASSIE COLOIDAL G-250	69
4.2.6 ANÁLISE DAS IMAGENS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	70
4.3. IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	71
4.3.1 EXCISÃO DOS SPOTS	71
4.3.2 DIGESTÃO TRÍPTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA	72
4.3.3 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	73
4.3.4 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTIR DOS ESPECTROS DE MASSAS	73
4.4 PREVISÃO DA LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	74
4.5 PREVISÃO E ANÁLISE DE VIAS METABÓLICAS E DE SINALIZAÇÃO CANÔNICAS E PROCESSOS CELULARES ASSOCIADOS COM AS MENINGITES	75

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1 ANÁLISE DO LÍQUOR DE PACIENTES COM MENINGITE	78
5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LÍQUOR.....	83
5.2.1 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL – SDS-PAGE	85
5.2.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL E ANÁLISE PROTEÔMICA DO LÍQUOR DE PACIENTES COM MENINGITE	86
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	105
5.3.1 GÉIS BIDIMENSIONAIS DE PROTEÍNAS DE <i>POOL</i> DO LÍQUOR DE PACIENTES COM MENINGITE.....	105
5.3.2 SELEÇÃO DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS MENINGITES.....	117
5.4 PREVISÃO DA LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	125
5.5 PREVISÃO E ANÁLISE DE VIAS METABÓLICAS E DE SINALIZAÇÃO CANÔNICAS E PROCESSOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS COM AS MENINGITES	127
5.5.1 VIAS METABÓLICAS E DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS ÀS MENINGITES	127
5.5.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS MENINGITES.....	139
6 CONCLUSÃO	148
7 PERSPECTIVAS.....	149
8 ANEXOS.....	150
8.1 PARECER 03/13 - ÁREA DE PATENTES GESTEC/VPPIS.....	150
9 APÊNDICES.....	158
9.1 Tabela A.1: Identificação por espectrometria de massas dos spots correspondentes ao conjunto interseção formado por géis 2D de proteínas do líquor de pacientes com meningite pneumocócica.....	158

9.2 Tabela A.2: Identificação por espectrometria de massas dos <i>spots</i> correspondentes ao conjunto interseção formado por géis 2D de proteínas do liquor de pacientes com meningite meningocócica.....	162
9.3 Tabela A.3: Identificação por espectrometria de massas dos <i>spots</i> correspondentes ao conjunto interseção formado por géis 2D de proteínas do liquor de pacientes com meningite viral.....	168
9.4 SIGLAS GENEGO	173
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contagem global de leucócitos no líquido de pacientes com meningite e controles.....	79
Figura 2: Proteínas totais no líquido de pacientes com meningite e controles.....	80
Figura 3: Contagem diferencial de leucócitos polimorfonucleares no líquido de pacientes com meningite e controles.....	80
Figura 4: Glicose no líquido de pacientes com meningite e controles.....	81
Figura 5: Perfil eletroforético de amostras de líquido de pacientes com meningite.....	86
Figura 6: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica.....	87
Figura 7: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica.....	88
Figura 8: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de pacientes com meningite viral.....	89
Figura 9: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de indivíduos controles.....	90
Figura 10: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção de pacientes com meningite pneumocócica.....	92
Figura 11: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção de pacientes com meningite meningocócica.....	93
Figura 12: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção de pacientes com meningite viral.....	94

Figura 13: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção do grupo de indivíduos controles.....	95
Figura 14: Gel <i>master</i> do subconjunto interseção de pacientes com meningite pneumocócica em comparação aos conjuntos união de indivíduos controles e demais etiologias de meningite.....	98
Figura 15: Gel <i>master</i> do subconjunto interseção de pacientes com meningite meningocócica em comparação aos conjuntos união de indivíduos controles e demais etiologias de meningite.....	99
Figura 16: Gel <i>master</i> do subconjunto interseção de pacientes com meningite viral em comparação aos conjuntos união de indivíduos controles e demais etiologias de meningite.....	100
Figura 17: Diagrama de Venn para a distribuição de <i>spots</i> do subconjunto interseção de meningite pneumocócica.....	101
Figura 18: Diagrama de Venn para a distribuição de <i>spots</i> do subconjunto interseção de meningite meningocócica.....	102
Figura 19: Diagrama de Venn para a distribuição de <i>spots</i> do subconjunto interseção de meningite viral.....	103
Figura 20: Imagem de <i>spots</i> únicos para as meningites.....	104
Figura 21: Géis bidimensionais de <i>pool</i> de proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica.....	106
Figura 22: Géis bidimensionais de <i>pool</i> de proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica.....	107
Figura 23: Géis bidimensionais de <i>pool</i> de proteínas do líquido de pacientes com meningite viral.....	108

Figura 24: Modelo preditivo qualitativo de biomarcadores proteicos da meningite.....	118
Figura 25: Previsão da localização celular das proteínas identificadas que compõem os conjuntos união e subconjuntos interseção da meningite.....	126
Figura 26: Distribuição das vias canônicas representada pelo GeneGo MetaCore™.....	133
Figura 27: Distribuição de processos celulares Gene Ontology (GO) representado pelo MetaCore™.....	133
Figura 28: Mapa canônico de coagulação sanguínea representado pelo GeneGo MetaCore™.....	134
Figura 29: Mapa canônico do papel da transcrição de Akt na ativação de HIF1 induzida por hipóxia, representado pelo GeneGo MetaCore™.....	138
Figura 30: Distribuição de processos celulares GeneGo, representado pelo MetaCore™.....	141
Figura 31: Distribuição de doenças associadas à biomarcadores, representado pelo MetaCore™.....	142
Figura 32: Receptores de cinina B1 e B2 e a produção de NO mediada por nNOS.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da população selecionada para o estudo proteômico comparativo.....	62
Tabela 2: Diluição de amostras de líquido para quantificação de proteínas.....	66
Tabela 3: Valores de sensibilidade e especificidade dos parâmetros citoquímicos do líquido para as meningites.....	82
Tabela 4: Concentração proteica de amostras de líquido bacterianas, virais e controles.....	84
Tabela 5: Número de <i>spots</i> que compõem os subconjuntos interseção e conjuntos união do líquido de pacientes com meningite e controles.....	91
Tabela 6: <i>Spots</i> definidos na análise comparativa entre as diferentes etiologias de meningite e grupo controle.....	97
Tabela 7: Matriz dos <i>spots</i> do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite pneumocócica.....	112
Tabela 8: Matriz dos <i>spots</i> do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica.....	113
Tabela 9: Matriz dos <i>spots</i> do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite viral.....	115
Tabela 10: Matriz de presença/ausência das proteínas selecionadas para composição do modelo preditivo qualitativo.....	118
Tabela 11: Identificação dos <i>spots</i> correspondentes às proteínas selecionadas como biomarcadores pelo modelo preditivo qualitativo.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico;

ADP: adenosina difosfato;

Anti-Hib: vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b;

Arg: arginina;

AT: antitrombina;

ATP: adenosina trifosfato;

BHE: Barreira hemato-encefálica;

BSA: albumina de soro bovino;

CA: Califórnia;

Ca⁺²: cálcio;

CHAPS: 3-colamidopropil dimetilamônio-1-propanosulfonado;

ChoP: fosforilcolina;

CONEP: Conselho Nacional de Ética em Pesquisa;

CO₂: dióxido de carbono;

COX: cicloxigenase;

CTRL: controle;

C3: componente C3 do sistema do complemento;

dL: decilitro;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

DP: desvio-padrão;

DTT: ditionitrito;

EA: análise de enriquecimento;

EAA: aminoácidos excitatórios;

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial;

EUA: Estados Unidos da América;

ERK: quinase reguladora de sinal extracelular;

EVs: enterovírus;

FDA: Federação Americana de Drogas e Alimentos;

Fe: ferro;

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz;

Funed: Fundação Ezequiel Dias;

g: grama;

Gln: glicina;

Glu: glutamina;

GO: *Gene ontology*;

GPCR: receptor acoplado à proteína G;

h: hora;

HCl: ácido clorídrico;

HDL: lipoproteína de alta densidade;

Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b;

HIF: fator induzido por hipóxia;

HK: cininogênio de alto peso molecular;

HSV: Herpes simplex vírus;

H₂O: água;

H₂O₂: peróxido de hidrogênio;

ICAM: molécula de adesão intercelular;

ID: identificador;

IEF: focalização isoeletrica;

IFN-γ: interferon γ;

IgG: imunoglobulina G;

IL: interleucina;

iNOS: óxido nítrico sintase induzível;

IPG: gradiente imobilizado de pH;

F1+2: fragmento protrombina;

kDa: kilodalton;

KKS: sistema cinina-caliceína;

LK: cininogênio de baixo peso molecular

LPS: lipopolissacarídeo;

M: molar;

MA: meningite asséptica;

MB: meningite bacteriana;

MALDI: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*;

MAPK: proteína cinase ativadora de mitógeno;

MenC: vacina polissacarídica conjugada contra o sorogrupo C de *Neisseria meningitidis*;

mg: miligrama;

mL: mililitro;

mm: milímetro;

mM: milimolar;

MM: meningite meningocócica;

MMP: metaloproteinase de matriz;

MP: meningite pneumocócica;

MS: espectrometria de massas;

MS/MS: espectrometria de massas em sequência;

MV: meningite viral

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo;

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*;

NF- κ B: fator nuclear *kappa* b;

nm: nanômetro;

nM: nanomolar;

NMDA: N-metil-D-aspartato;

NO: óxido nítrico;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

O₂⁻: ânion superóxido;

ONOO⁻: peroxinitrito;

PAF: fator ativador de plaquetas;

PAI: inibidor da ativação de plasminogênio do tipo 1;

PARP: poli-adenosina difosfato ribose;

PCR: reação em cadeia da polimerase;

PCVs: vacinas polissacarídicas conjugadas;

PDTIS: Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde;

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase;

pH: potencial hidrogeniônico;

PMN: células polimorfonucleares;

Por: porinas;

PPM: partes por milhão;

RNA: ácido ribonucleico;

RNS: espécies reativas de nitrogênio;

ROS: espécies reativas de oxigênio;

rPAF: receptor do fator ativador de plaquetas;

RPT: Rede de Plataformas Tecnológicas;

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real;

SDS: dodecil sulfato de sódio;

SDS-PAGE: gel desnaturante de poliacrilamida;

SIADH: Síndrome da secreção inadequada do hormônio antidiurético;

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

SNC: sistema nervoso central;

SVM: *support vector machine*;

TaT: complexo trombina-antitrombina;

TF: fator tecidual;

TFPI: inibidor do fator tecidual;

TGF- β : fator transformador de crescimento β ;

TIMP: inibidor tecidual da metaloproteinase;

TNF- α : fator de necrose tumoral α ;

ToF: tempo de vôo;

tPA: ativador de plasminogênio do tipo tecidual;

uPA: ativador de plasminogênio do tipo uroquinase;

V: volts;

VCAM: molécula de adesão celular vascular;

VZV: Varicela zoster vírus;

μ A: microampère;

μ L: microlitro;

μ g: micrograma;

$^{\circ}$ C: grau Celsius;

2-DE: eletroforese bidimensional;

2D-PAGE: eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida;

$\cap$: interseção;

U: união;

α : alfa;

β : beta.

RESUMO

Meningite é a inflamação das meninges em resposta a infecções ou exposição a agentes químicos. As meningites são classificadas como asséptica (MA) ou bacteriana (MB). Enquanto as MA, mais frequentemente causadas por enterovírus, geralmente são benignas e de curso autolimitado, as MB estão associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade que permanecem inalteradas apesar dos avanços nas terapias antimicrobianas e cuidados intensivos para a manutenção dos sistemas vitais dos pacientes. O diagnóstico preciso e rápido das meningites é fundamental para a tomada de decisão em tempo hábil pela abordagem terapêutica adequada para cada forma de meningite.

Neste trabalho, a associação de 2D-PAGE com espectrometria de massas permitiu a identificação de proteínas da resposta do hospedeiro para as meningites bacterianas – pneumocócica e meningocócica e para a meningite viral. Dentre estas proteínas, quatro são potenciais candidatos a biomarcadores para o diagnóstico diferencial das meningites e foram utilizadas para a construção de um modelo preditivo qualitativo com essa finalidade. Com a classificação de ausência/ presença de proteínas específicas da resposta do hospedeiro em cada condição patológica, foi possível diferenciar os pacientes com meningite pneumocócica, meningocócica, viral e os indivíduos sem infecção no sistema nervoso central. A descoberta desse modelo preditivo qualitativo proteico é o passo inicial para a construção de um kit rápido para o diagnóstico diferencial das meningites. A utilização deste kit poderá auxiliar na escolha da terapia adequada, de acordo com o agente etiológico, uma vez que o tratamento eficaz continua sendo a melhor alternativa para a redução das sequelas permanentes e de óbito associados à meningite bacteriana. Além disso, foram identificadas, por bioinformática, as principais vias metabólicas e de sinalização mais afetadas por cada uma das formas da doença, o que possibilitou a seleção de novos candidatos a alvos terapêuticos para as meningites.

ABSTRACT

Meningitis is the inflammation of the meninges in response to infection or chemical agents. The meningitis is classified as aseptic (MA) or bacterial (MB). While MA, most frequently caused by enteroviruses, is usually benign and self-limiting course, MB remains associated with high morbidity and mortality rates, despite advances in antimicrobial therapy and intensive care for the maintenance of patient's vital systems. The fast and accurate diagnosis of meningitis is crucial for decision making to the appropriate therapeutic approach for each meningitis form.

In this work, the association of 2D-PAGE with mass spectrometry allowed the identification of host response proteins to bacterial meningitis – pneumococcal and meningococcal, and viral meningitis. Among these proteins, four are potential candidate biomarkers for the differential diagnosis of meningitis and were used to build a qualitative predictive model for this purpose. Sorting absence / presence of specific proteins in the host response in each pathological condition became possible to differentiate pneumococcal, meningococcal, viral meningitis those individuals without central nervous system infection. The discovery of this novel qualitative predictive model is the beginning step for generation of a fast kit for differential meningitis diagnosis. It could provide individualized therapy according to the causative etiological agent of illness, once the effective treatment remains the best choice for lower permanent sequelae and mortality due to bacterial meningitis.

Furthermore, were identified, by bioinformatics, the main metabolic and signaling pathways most affected by each meningitis form, which enabled the selection of novel candidate therapeutic targets for meningitis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiologia e patofisiologia das meningites

A meningite é caracterizada pela inflamação das finas membranas leptomeníngeas – dura mater, aracnoide e pia mater – que circundam o cérebro e a medula espinhal (1-3). Esta doença pode resultar de inúmeras causas, infecciosas, ou não, e é comumente classificada em asséptica ou bacteriana (1). O termo “meningite asséptica” se refere à inflamação meníngea sem evidência de infecção bacteriana causativa nem, tampouco, envolvimento do parênquima cerebral (encefalite) ou da medula espinhal (mielite) (4). A meningite asséptica pode ser causada por vírus, fungos, desordens do tecido conectivo adjacente ou por agentes químicos. Mais de 80% dos casos de meningite viral são originados por enterovírus, mas outros grupos menos frequentes como arbovírus, herpes simples vírus e varicela podem causar esta doença. Geralmente, a meningite por enterovírus apresenta um curso clínico benigno não associado à mortalidade (4, 5). A meningite bacteriana, por outro lado, é caracterizada pela resposta inflamatória exacerbada no sistema nervoso central (SNC) e, frequentemente, evolui para o desenvolvimento de sequelas neurológicas permanentes, ou óbito (1, 3).

1.1.1 Microbiologia das meningites bacterianas

A meningite bacteriana é uma das dez principais causas de morte por infecções no mundo, sendo que aproximadamente metade dos sobreviventes desenvolve sequelas neurológicas permanentes. Os principais patógenos causadores desta doença são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* (6). O homem é considerado um importante reservatório

destes três microrganismos que colonizam de forma assintomática e em um estado comensal sua nasofaringe (7-10).

A seguir, serão apresentados alguns aspectos microbiológicos dos principais patógenos causadores de meningite.

1.1.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae* é um organismo gram-positivo encapsulado, anaeróbico facultativo que pode apresentar-se como cocos isolados, aos pares (diplococos) ou em cadeias curtas (11). *S. pneumoniae* é catalase e oxidase-negativo que produz ácido láctico a partir da fermentação da glicose. A propriedade α -hemolítica de *S. pneumoniae* permite diferenciá-lo de muitas espécies, mas não do comensal α -hemolítico *Streptococcus* do grupo *viridans*, que coloniza a cavidade oral humana. Todavia, colônias de *S. pneumoniae* se tornam achatadas com uma área de depressão central após 24-48h de crescimento em ágar-sangue, decorrente do processo de autólise, fato que não é visualizado em *Streptococcus* do grupo *viridans*. Além disso, *S. pneumoniae* é sensível ao desoxicolato de sódio (bile) e a optoquina (cloridrato de etilhidrocupreína), o que permite distinguir esta espécie de outros *Streptococcus* α -hemolíticos que são resistentes a esses detergentes (11).

O principal fator de virulência de *S. pneumoniae* é a sua cápsula polissacarídica que permite a diferenciação de pelo menos 91 sorotipos reconhecidos até o presente (11).

1.1.1.2 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis é um organismo encapsulado, aeróbico e gram-negativo que normalmente ocorre em pares (diplococos) com os lados adjacentes achatados (reniformes), podendo, em esfregaços de sangue ou líquido, ser

observado no interior de leucócitos polimorfonucleares (11). As neisserias são organismos móveis e oxidase-positivos que produzem ácidos a partir da oxidação, e não da fermentação. *N. meningitidis* oxida glicose e maltose, mas não lactose e sacarose o que permite sua diferenciação das demais espécies do gênero (11).

Variações na cápsula polissacarídica permitem a classificação desta bactéria em 13 sorogrupos (12, 13), sendo que os seis potencialmente infecciosos são A, B, C, W135, X e Y (14). Polimorfismos na proteína da membrana externa porina B são usados para definir diferentes sorotipos e na porina A para diferentes sorosubtipos (11). O contato próximo e prolongado de pessoas confinadas, como estudantes e militares, além do compartilhamento de utensílios e contato íntimo favorece a propagação da doença que frequentemente ocorre na forma de surtos, epidemias e, até mesmo, pandemias (11).

1.1.1.3 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae é um organismo anaeróbico facultativo, polimórfico e gram-negativo em forma de bacilo que pode ser encapsulado ou não, sendo que estas duas formas podem causar infecção (15). Este organismo fastidioso requer a suplementação dos meios de cultura com hemina (fator X) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD ou fator V). *H. influenzae* é oxidase-positivo e pode ser diferenciado da maioria das demais espécies do gênero *Haemophilus* por requerer ambos os fatores X e V para seu crescimento (6, 11). Apenas *H. haemolyticus* compartilha dessa exigência nutricional, mas este, ao contrário de *H. influenzae* (não hemolítico), produz β -hemólise (hemólise total) em células do meio ágar sangue.

A parede celular de *H. influenzae* contém o lipopolissacarídeo (LPS) com atividade de endotoxina e proteínas cepa-específicas e espécie-específicas estão presentes na membrana externa (6). Existem seis sorotipos (A, B, C, D, E, e F) caracterizados de acordo com configurações da cápsula polissacarídica, sendo o *H. influenzae* tipo b (Hib) o principal sorotipo patogênico (6). O organismo *H. influenzae* não capsulado coloniza o trato respiratório superior de praticamente todos os indivíduos nos primeiros meses de vida, enquanto a bactéria capsulada é incomum

no trato respiratório superior, mas é causa frequente de doenças em crianças não vacinadas contra este patógeno (11).

1.1.2 Patofisiologia das meningites bacterianas

Os principais patógenos causadores de meningite bacteriana podem ser transmitidos por aerossóis ou por contato direto com secreções de pacientes ou portadores saudáveis (11). Para causar meningite, o microrganismo deve colonizar a mucosa da nasofaringe, atravessá-la para atingir a corrente sanguínea, sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro no espaço intravascular, invadir a barreira hematoencefálica (BHE) e replicar-se no espaço subaracnoide desencadeando a doença (16). Esses mecanismos patofisiológicos são apresentados a seguir.

1.1.2.1 Colonização

Os patógenos encapsulados *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e *H. influenzae* residem na mucosa da nasofaringe humana sem causar prejuízos ao hospedeiro (17). Por motivos ainda não esclarecidos, o microrganismo abandona seu estado comensal e dá início à invasão. A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência dessas bactérias, sendo que a sua presença reduz o aprisionamento dos patógenos pelo muco, permitindo seu acesso à superfície epitelial da nasofaringe (18). O *S. pneumoniae* produz a exotoxina pneumolisina que diminui o batimento ciliar das células epiteliais favorecendo a aderência bacteriana ao epitélio (19). Além disso, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* produzem a protease de IgA1 que cliva esta imunoglobulina humana secretada, facilitando o processo de colonização (20, 21). O transporte de *S. pneumoniae* para a membrana basal das células epiteliais da mucosa nasofaríngea do hospedeiro é favorecido pela ligação da fosforilcolina (ChoP) bacteriana com o receptor do fator ativador de plaquetas (rPAF) (22). Esta migração do patógeno pode levar à doença invasiva.

1.1.2.2 Sobrevivência na corrente sanguínea

Na corrente sanguínea, os mecanismos de defesa adicionais do hospedeiro tentam combater a invasão bacteriana (17). O sistema do complemento representa o primeiro passo da imunidade inata contra a bacteremia (17). A cápsula polissacarídica age como uma barreira inespecífica, diminuindo a deposição do complemento na superfície bacteriana e, assim, limitando a interação desta com os fagócitos (22, 23). Proteínas da superfície do patógeno se ligam especificamente aos componentes do complemento, dificultando a remoção bacteriana por esse sistema (17). Por exemplo, a ligação de proteínas bacterianas ao fator H inibe a atividade de C3 convertase, levando à diminuição da produção de C3b e, consequentemente, limitando a fagocitose (24).

O dano tecidual endotelial observado durante a invasão bacteriana deve-se primariamente aos mecanismos de defesa imune do hospedeiro. Por exemplo, o meningococo libera vesículas da membrana externa ricas em endotoxina na corrente sanguínea que se liga às proteínas plasmáticas ligadoras de endotoxina (25). Receptores de endotoxina como o CD14 e os do tipo *toll* ativam células inflamatórias da resposta imune como os macrófagos que, por sua vez, estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), as interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6) e o interferon γ (IFN- γ) (26-29). Geralmente, os níveis aumentados destas citocinas correlacionam-se positivamente com a severidade da doença e a mortalidade do hospedeiro.

1.1.2.3 Invasão bacteriana e resposta imune no sistema nervoso central

O SNC é protegido pelo crânio, pelas leptomeninges e pela BHE. A BHE é composta de células endoteliais microvasculares cerebrais, astrócitos e perícitos (30). Esta barreira modula o microambiente neural regulando a entrada e saída de moléculas para o SNC, além de preservá-lo de microrganismos eventualmente

presentes no sangue (31). O mecanismo que permite a invasão de patógenos através da BHE ainda não está bem esclarecido, mas parece ocorrer nas veias e vênulas pós-capilares cerebrais (32). As junções apertadas interendoteliais destas estruturas são fracas e permitem o extravasamento de leucócitos e moléculas plasmáticas no espaço perivascular (33, 34). Pela proximidade das veias pós-capilares com o espaço subaracnoide, sugere-se que estas estruturas possam ser o sítio de passagem dos microrganismos para o líquido. A adesão do patógeno às células endoteliais pode induzir uma sinalização intracelular que favorece o rompimento das junções apertadas intercelulares ou a sua própria transcitose através da monocamada celular (35).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) compõem a família de endopeptidases dependentes de Zn^{+2} e Ca^{+2} e atuam como facilitadores da migração celular, por meio do remodelamento tecidual e da degradação dos constituintes da BHE, e também interagem com citocinas (36). A expressão das MMPs pelas células da glia e astrócitos é aumentada na neuroinflamação. As MMPs provocam o rompimento da membrana basal subendotelial dos capilares favorecendo o rompimento da BHE. A atividade das MMPs é regulada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (37, 38). Na meningite bacteriana, os níveis de MMP-8, MMP-9 e TIMP-1 estão elevados de 10 a 1.000 vezes mais do que na meningite viral (36). Na meningite meningocócica, o aumento das MMPs, primariamente a MMP-8, contribui para a clivagem da proteína ocludina que compõe as junções apertadas da BHE provocando o rompimento destas conexões celulares (39).

Após a entrada no espaço subaracnoide, as bactérias liberam produtos altamente imunogênicos, como peptidioglicanos e fragmentos da parede celular que levam ao aumento da resposta inflamatória do hospedeiro (30). As células da glia são importantes para iniciar os primeiros eventos da resposta imune, uma vez que expressam a maioria dos receptores *toll* que são capazes de reconhecer produtos imunogênicos liberados pelos patógenos no SNC (40). As células da glia produzem TNF- α e IL-1 β que são as principais citocinas pró-inflamatórias do sistema imune (41). IL-1 β favorece a adesão de neutrófilos e monócitos nas células endoteliais. Além disso, IL-1 β favorece a produção de IL-6 que é um potente indutor da expressão de proteínas de fase aguda e da migração de leucócitos do sangue para o SNC, além de induzir febre (42-46). Por outro lado, as células da glia, neurônios,

macrófagos e demais células do sistema imune produzem citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10, cuja concentração também está elevada no líquido e no plasma durante a meningite bacteriana. No entanto, o que se observa durante o curso das meningites bacterianas é uma resposta inflamatória exacerbada que, juntamente com fatores liberados pelos patógenos em decorrência da autólise acarretam as lesões cerebrais associadas à doença.

1.1.2.4 Dano neuronal

O recrutamento de leucócitos para o líquido (pleocitose) é característico da meningite bacteriana. Essas células são estimuladas a produzir espécies reativas de nitrogênio (RNS), tais como o óxido nítrico (NO), que é sintetizado pelas enzimas óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) (47, 48). A liberação de NO pelas diferentes isoformas de NOS possui funções distintas e efeitos potencialmente opostos em condições patológicas. O NO transitório derivado de eNOS possui um considerável papel na manutenção da integridade da BHE em condições patológicas. Entretanto, em condições normais, o NO não age como modulador da permeabilidade vascular dentro do SNC (49). Por outro lado, a produção de NO derivado do iNOS é prolongada e parece contribuir para o rompimento da BHE e para a produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 β . Este fato relaciona-se ao desenvolvimento de complicações intracranianas e de dano cerebral observados na meningite bacteriana (48).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila são produzidos pelas células residentes do sistema imune cerebral como parte da resposta do hospedeiro à infecção bacteriana (50). O patógeno também produz H_2O_2 que, apesar de não causar por si só dano citotóxico direto, interage com o NO do hospedeiro formando o peroxinitrito ($ONOO^-$) (51, 52), uma espécie altamente reativa com efeitos neurotóxicos. O $ONOO^-$ pode iniciar a peroxidação lipídica e potencializar a lesão inflamatória em neurônios e células da glia (53). Ademais, este ânion pode causar fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e subsequente ativação excessiva da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) que leva a morte celular (16). A PARP-1 é

uma enzima nuclear seletivamente ativada pela quebra das fitas de DNA. Esta enzima catalisa a transferência de subunidades de adenosina difosfato (ADP) ligada à ribose (ADP-ribose) a partir de seu substrato β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) para uma variedade de proteínas, inclusive a própria PARP. Esta contribui para o reparo do DNA, provavelmente por favorecer o acesso de outras enzimas de reparo aos seus substratos. Entretanto, o dano do DNA provoca uma ativação exacerbada da PARP que consome os estoques de NAD^+ . Consequentemente, a produção de NAD^+ utiliza as reservas de adenosina trifosfato (ATP). Esse processo provoca a morte celular que pode ser anulada pelos inibidores da PARP ou pela supressão do seu gene (54-58).

O dano celular também pode ser originado pelos níveis aumentados dos aminoácidos excitatórios (EAA) aspartato e glutamato. A excitotoxicidade é um tipo de morte neuronal induzida pela estimulação exacerbada dos receptores de glutamato, particularmente o N-metil-D-aspartato (NMDA). Este receptor, que age como um canal iônico é altamente permeável ao Ca^{+2} , o que sob excessiva estimulação, resulta em um massivo influxo desse íon para o interior da célula. Por sua vez, os níveis elevados de Ca^{+2} intracelular ativam diversas rotas enzimáticas que contribuem para a perda da homeostase celular favorecendo o dano neuronal (59, 60).

A surdez é uma sequela permanente comum em pacientes que sobrevivem à meningite bacteriana. O ouvido interno é composto por um conjunto de canais e cavidades revestido por tecido ósseo que, por sua vez, é ocupado parcialmente por estruturas membranosas denominadas labirinto membranoso. O espaço entre o labirinto ósseo e o membranoso é uma continuação do espaço subaracnoide das meninges, preenchido com a perilinfa que apresenta composição similar a do líquido. A cóclea é uma extensão do labirinto ósseo do ouvido e seu envolvimento na meningite pode resultar da propagação direta da infecção bacteriana das meninges, líquido e sistema perilinfático coclear (61, 62). Uma severa inflamação granulocítica do espaço perilinfático é resultante da infiltração coclear pelo microrganismo e por neutrófilos. O influxo destes últimos para a região coclear é favorecido pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$ (63). Em modelo experimental de meningite pneumocócica com ratos infantis, a severidade da surdez permanente correlacionou-se com a perda de neurônios do gânglio nervoso da cóclea denominado de gânglio espiral (63).

1.1.3 Meningites virais

1.1.3.1 Família *Picornaviridae*

1.1.3.1.1 *Enterovirus*

O gênero *Enterovirus*, da família *Picornaviridae* apresenta 69 sorotipos que infectam humanos como: a) poliovírus 1-3; b) coxsackievírus A₁-A₂₄ e B₁-B₆; c) echovírus 1-33 e, d) enterovírus EV68 a EV73. Os enterovírus (EVs) são um dos menores vírus conhecidos, sendo compostos por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) contida em um capsídeo icosaédrico não envelopado de 20 a 30nm. A transmissão dos enterovírus ocorre, principalmente, por contaminação com perdigotos, ou ainda por transmissão oral-fecal devida às condições precárias de higiene. (64). Os enterovírus são os principais agentes etiológicos de meningite viral, respondendo por aproximadamente 80% dos casos (65, 66).

1.1.3.2 Família *Herpesviridae*

Esta família compreende vírus de DNA dupla fita compostos por um nucleocapsídeo icosaédrico com diâmetro externo de 125-130nm revestido por um envelope lipídico (67). Importantes agentes etiológicos de meningite viral incluem: herpes simplex vírus, varicela-zoster, citomegalovírus, Epstein-Barr, dentre outros.

1.1.3.2.1 *Herpes simplex*

O vírus *Herpes simplex* é o principal causador de infecções no SNC dentre os demais vírus do grupo Herpesvirus (68). *Herpes simplex* pertence ao gênero *Simplexvirus* da subfamília *Alphaherpesvirinae*, sendo que há dois tipos deste vírus: a) Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) e b) Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2), que podem ser diferenciados por variações antigênicas presentes em proteínas do envelope (69). A transmissão de HSV é feita por contato pessoal à superfície da mucosa orofaríngea (principalmente, HSV-1) ou mucosa genital (HSV-2, primariamente) (70). A infecção por HSV causa lesões recorrentes em mucosas, podendo resultar em complicações neurológicas como encefalite, mielite, meningite e, ocasionalmente, radiculite (5, 68).

1.1.3.2.2 *Varicella zoster*

O vírus *Varicella zoster* pertence ao gênero *Varicellovirus* da subfamília *Alphaherpesvirinae*. A infecção primária pelo vírus Varicela zoster (VZV) causa varicela ou catapora e estabelece latência nos gânglios sensoriais, sendo que a reativação do vírus resulta em Herpes zoster (67). A transmissão é feita por via aérea, a partir de aerossóis oriundos de lesões de pele vesiculares de indivíduos acometidos por varicela ou herpes zoster (71). Complicações neurológicas associadas à VZV são raras, mas incluem meningite viral, meningoencefalite e cerebelite (72).

1.1.3.3 Família *Flaviviridae*

Esta família compreende vírus esféricos de RNA de cadeia positiva com diâmetro de 40-50nm que contém um envelope lipídico com uma superfície glicoproteica e uma matriz proteica interna. Importantes agentes etiológicos de

meningite viral incluem: vírus do oeste do Nilo, vírus da encefalite St. Louis e da encefalite japonesa.

1.1.3.3.1 Vírus do oeste do Nilo

O vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus*) pertence ao gênero *Flavivirus*. *Flaviviridae* é uma das principais famílias do grupo dos arbovírus (do inglês, *arthropod-borne virus*), que constituem um grupo de vírus transmitido biologicamente por meio da picada de um artrópode hematófago infectado para um vertebrado susceptível. O vírus do oeste do Nilo é mantido naturalmente por pássaros e transmitido, principalmente, pelo mosquito do gênero *Culex* que é amplamente distribuído em áreas urbanas (73). Recentemente, epidemias na Europa e América do Norte têm sido associadas com altas taxas de doença severa pelo vírus do oeste do Nilo, incluindo meningite, encefalite e paralisia flácida aguda (74).

1.1.4 Patofisiologia das meningites virais

Os mecanismos patofisiológicos da meningite viral não são bem esclarecidos. Acredita-se que a propagação dos vírus causadores de meningite no SNC envolva a invasão hematogênica (75). Os enterovírus (EV) infectam enterócitos no trato intestinal (76). Posteriormente, atravessam a parede intestinal até o tecido linfóide associado ao intestino onde ocorre a replicação primária. A consequente viremia pode atingir múltiplos tecidos como o fígado, os pulmões, o coração e o SNC (76). Para atingir o espaço subaracnoide, as partículas virais passam diretamente através da BHE por difusão capilar, ou se ligam a leucócitos infectados para posteriormente infectar células endoteliais. Outra via importante de entrada, principalmente para herpes simplex vírus, é a propagação neuronal retrógrada. O HSV pode penetrar no cérebro através do nervo olfatório, podendo causar encefalite nos lobos temporais. A primeira linha de defesa do SNC contra a invasão viral é mediada por linfócitos e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6. Entretanto, a atuação das citocinas na resposta do hospedeiro contra a meningite viral é limitada em

comparação à meningite bacteriana, o que resulta em manifestações clínicas mais brandas com ausência de sequelas neurológicas graves. A severidade das complicações depende da extensão da replicação viral no SNC e se a infecção é propagada para regiões cerebrais além das meninges, causando outras doenças, como a meningoencefalite (68, 77).

1.2 Epidemiologia das meningites no Brasil e no mundo

Embora a meningite bacteriana seja considerada um significativo problema de saúde pública em diversas regiões do mundo, principalmente em países em desenvolvimento, o perfil epidemiológico dessa doença tem se alterado nos últimos anos (6, 78, 79). Recentemente, grandes avanços têm sido feitos para aprimorar o acesso da população mundial às vacinas polissacarídicas conjugadas que previnem as principais formas de meningite bacteriana. Contudo, a proteção das vacinas atuais é limitada e associada aos sorogrupos ou sorotipos presentes nas preparações vacinais (6). Na próxima seção, são discutidos os principais aspectos epidemiológicos das meningites em suas principais formas – bacteriana e viral.

1.2.1 Situação epidemiológica atual das meningites bacterianas

A meningite bacteriana é considerada um grave problema de saúde pública com altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, sendo que cerca de 1,2 milhões de casos anuais desta doença ocasionam 135.000 mortes (6). A maior parte dos casos de meningite ocorre durante a estação seca. Desde a introdução da vacina contra *H. influenzae* (anti-Hib), no final da década de 80, os patógenos *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* se tornaram os principais causadores de meningite bacteriana (78). No entanto, ainda se observam altas taxas de meningite por Hib em regiões que ainda não adotaram a vacina contra este patógeno (15).

A meningite pneumocócica tem incidência de 17 casos por 100.000 habitantes em crianças menores de cinco anos, com taxas de mortalidade de até 75% em algumas regiões do mundo (80). A menor incidência é registrada na Europa, enquanto na África as taxas são as mais elevadas do mundo (38 casos por 100.000 habitantes). A mortalidade média mundial é de 59%, sendo 29% no Pacífico Ocidental e 73% na África (80). No Brasil, a estimativa total de hospitalizações devidas à meningite pneumocócica chegou a 15,78 casos por 100.000 habitantes, em 2006, com mais de 1.000 mortes de 2004 a 2006, o que corresponde a uma taxa

de mortalidade de 31,7% para todas as idades (81). Dentre os pacientes que sobrevivem à meningite pneumocócica, aproximadamente 30% desenvolvem sequelas neurológicas permanentes, como déficit de atenção, surdez e desordens mentais (82). A introdução das vacinas polissacarídicas conjugadas contra meningite pneumocócica (PCVs) em programas nacionais de imunização em mais de 90 países tem reduzido consideravelmente os casos da doença em todo o mundo. Ao mesmo tempo, sorotipos não cobertos pelas PCVs passaram a causar a maioria dos casos remanescentes de meningite pneumocócica nestes países, fenômeno denominado substituição de sorotipos (83). No Brasil, os sorotipos de *S. pneumoniae* 14, 23F, 6B e 19F são os principais causadores de doença pneumocócica. Estes sorotipos estão incluídos na PCV 10-valente que foi introduzida no calendário nacional de imunização pelo Ministério da Saúde, em 2010, abrangendo crianças menores de dois anos de idade. A disponibilização da vacina PCV-10 se deve ao acordo de transferência tecnológica entre o laboratório GlaxoSmithKline – GSK e o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos/FIOCRUZ que passou a produzir esta vacina para todo o país (84). Em 2011, observou-se uma redução de 30% no número de casos de meningite pneumocócica para a faixa etária coberta pela PCV-10 (85).

A Europa registra 0,92 casos de doença meningocócica por 100.000 habitantes (86) enquanto na África, as taxas de incidência são de 100 a 1.000 casos por 100.000 habitantes (87). A África Subsaariana possui características climáticas e hábitos sociais particulares que podem explicar a presença de epidemias de meningite meningocócica nessa região. Durante a estação seca (dezembro a junho), a ocorrência de fortes ventos de poeira juntamente com as noites frias propicia o aumento de infecções no trato respiratório superior que reduzem a imunidade local da faringe. Ao mesmo tempo, os ambientes familiares superlotados e o deslocamento da população devido a peregrinações ou ao estabelecimento de mercados tradicionais regionais contribuem para a propagação da doença. Além disso, a imunização de rebanho, onde a transmissão da doença é bloqueada devida à imunização natural de uma porcentagem crítica da população que teve contato com uma dada linhagem epidêmica de meningococo que, então, estende a proteção a pessoas não vacinadas, favorece a ocorrência de episódios epidêmicos cíclicos (88).

Após a introdução da vacina meningocócica contra o sorogrupo C, a partir de 1999, o número de casos de meningite por esse sorogrupo reduziu em todo o mundo, embora em países em desenvolvimento ainda sejam observados muitos casos. Atualmente, o sorogrupo B tem liderado o número de casos de doença meningocócica na Europa, respondendo por 71% do total de casos, seguido dos sorogrupos C (13%) e Y (4%). Com o aumento do número de casos de doença meningocócica atribuídos ao sorogrupo B, diversos laboratórios têm investigado vacinas contra esse sorogrupo utilizando diferentes abordagens (89-91). O laboratório Novartis anunciou que a primeira vacina produzida contra o sorogrupo B a partir de proteínas antigênicas de *Neisseria* pode ser disponibilizada comercialmente ainda no ano de 2013 (92).

A incidência da doença meningocócica no Brasil é de aproximadamente 1,8 casos por 100.000 habitantes. Em 2010, o sorogrupo C foi responsável por 75% dos casos, seguido do sorogrupo B (17%), sorogrupos W135 (6%) e Y (2%) (93). No Brasil, foi estabelecido um acordo de transferência tecnológica da vacina contra o sorogrupo C de *N. meningitidis* (MenC) entre a Novartis, a Fundação Ezequiel Dias (Funed) e o governo de Minas Gerais que permitiu a vacinação de todas as crianças menores de dois anos deste estado (540 mil crianças) a partir do segundo semestre de 2009. Além de ser o primeiro estado brasileiro a disponibilizar gratuitamente a vacina MenC, o governo de Minas obteve uma economia de aproximadamente 70% por dose da vacina por meio da fabricação local (94, 95). Posteriormente, o Ministério da Saúde incluiu a vacina MenC no programa nacional de imunização que beneficiará todas as crianças menores de dois anos do país, a partir do segundo semestre de 2010 (aproximadamente três milhões de crianças). O Brasil foi o primeiro país da América Latina a incorporar a vacina MenC em seu programa nacional de imunização. A Funed também participou deste acordo e disponibilizou a maior parte destas vacinas, além de contribuir para a imunização de alguns países do Mercosul (95, 96). Em 2011, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) confirmou mais de 20 mil casos de meningite no Brasil ($n = 20.756$), com 36,8% ($n = 7.610$) desse montante atribuído às meningites bacterianas. Considerando qualquer grupo etário, o SINAN registrou mais de 2.800 casos de meningite meningocócica somente em 2011, sendo a principal causa de meningite no país. Apesar disso, após a introdução da vacina MenC observou-se uma redução

de 29% no número de casos de doença meningocócica em crianças menores de dois anos de idade (97).

1.2.2 Situação epidemiológica atual das meningites virais

Aproximadamente 80% dos casos de meningite viral são causados pelo grupo dos enterovírus, dentre os quais se destacam os poliovírus, os echovírus e os coxsackievírus dos grupos A e B. Outros grupos de vírus capazes de causar meningite, mas com menor frequência são os arbovírus, o herpes simples vírus, além dos vírus da caxumba, varicela e sarampo (68). A incidência é maior no verão em países com clima temperado e praticamente o ano todo em países tropicais (4), com aumento do número de casos na primavera e no verão. Indivíduos de todas as faixas etárias são susceptíveis à doença, embora predominem os casos em crianças menores de cinco anos (68). Dentre os enterovírus, o echovírus (E) é o principal causador de meningite viral, sendo que os genótipos E6, E9, E11, E13, E19 e E30 são detectados com maior frequência em pacientes com a doença (68, 98-101). Embora a meningite por enterovírus tenha, na maior parte dos casos, curso clínico benigno, a infecção por echovírus pode causar incapacidade e desordem leves em crianças menores de cinco anos (102).

A meningite viral causada pelo vírus herpes simplex é principalmente atribuída ao HSV-2, com prevalência variando de 0,5 a 3% do total dos casos de meningite viral (68, 103). A meningite por HSV-2 pode ser causada pela reativação viral oriunda de uma infecção prévia de herpes genital, apesar de haver relatos de meningite herpética sem ocorrência recente de lesões genitais (104, 105). A meningite por HSV é considerada uma causa importante de morbidade e mortalidade em indivíduos imunodeficientes (103).

O vírus do oeste do Nilo foi introduzido nos Estados Unidos em 1999 e, desde então, surtos anuais tem registrado mais de 15.000 casos de doença severa com complicações neurológicas e mais de 1.500 mortes. Assim, o vírus do oeste do Nilo é considerado a principal causa de doença neuroinvasiva transmitida por mosquitos nos Estados Unidos (74).

Em 2011 no Brasil, o SINAN registrou mais de três mil casos de meningite viral ($n = 3.759$), o que corresponde a 18,2% do total de casos de meningite no país. Para a maioria dos casos, não há identificação do agente etiológico, exceto em surtos epidêmicos. Dentre os enterovírus, o echovírus 30 é o principal causador de surtos e de casos esporádicos de meningite viral no país, sendo responsável por mais de 80% dos casos da doença no período de 1998-2003. Os casos registrados no Brasil abrangem pessoas de 28 dias a 68 anos de idade, embora quase metade dos casos (45,3%) seja atribuída a crianças entre dois e seis anos de idade (98).

1.3 Métodos atuais para o diagnóstico diferencial das meningites

1.3.1 Sinais clínicos da meningite bacteriana

Os sinais e sintomas clínicos da meningite dependem da idade do paciente, do estágio da doença e da resposta do hospedeiro à infecção. A clássica tríade é estabelecida por febre, rigidez da nuca e estado mental alterado (1), e complementada pela observação dos sinais de Kernig e Brudzinski. Outros sintomas incluem sinal focal neurológico e aumento da pressão intracraniana (106). Os sinais de Kernig e Brudzinski juntamente com a rigidez da nuca são denominados sinais meníngeos que são altamente específicos para meningite bacteriana independente da faixa etária (1). O sinal de Kernig consiste em se posicionar o paciente em supino, decúbito dorsal, mantendo as pernas em ângulo reto (90°) e, posteriormente, estender as pernas observando se há sinal positivo de dor ou resistência (107). Há dois sinais de Brudzinski em pacientes com meningite. O primeiro deles consiste em flexionar o pescoço do paciente posicionado em supino e observar se os joelhos ou quadris acompanham a flexão. O segundo, também chamado de contralateral, envolve flexão passiva de uma perna para um lado que pode causar flexão contralateral da perna oposta (1). A maioria dos pacientes com meningite bacteriana, independente do agente etiológico, apresenta febre, estado mental alterado e perda da consciência. Vômito, rigidez da nuca e *rash* presente no interior de pontos hemorrágicos da pele (púrpura e petéquias) são mais característicos em casos de meningite meningocócica (79, 108, 109), embora o *rash* também seja relatado em alguns pacientes com meningite pneumocócica (110). Geralmente, pacientes com meningite pneumocócica apresentam convulsões, déficit focal neurológico e baixo nível de consciência, o que reflete a maior severidade desta forma da doença comparada à meningite meningocócica (79, 82).

1.3.2 Sinais clínicos da meningite viral

Pacientes com meningite viral apresentam febre, rigidez da nuca, fotofobia e vômitos sem evidência frequente de sinais meníngeos (4). Outros sintomas incluem mialgia, diarreia, tosse e *rash*. A meningite por enterovírus, comumente associada à febre, vômitos e dor de cabeça, ocorre em mais de 80% das crianças e adultos e pode levar a manifestações mucocutâneas que incluem vesículas localizadas na boca, mãos e pés (76). Em pacientes imunocomprometidos com meningite por HSVs podem ser observados febre, dor de cabeça, cansaço e rigidez da nuca (103).

1.3.3 Diagnóstico laboratorial

1.3.3.1 Parâmetros citoquímicos do líquido

O exame do líquido é essencial para confirmar o diagnóstico de meningite baseado nos sinais clínicos. A inflamação das meninges é responsável, pelo menos parcialmente, por alterações nos valores dos parâmetros citoquímicos analisados no líquido de pacientes com meningite bacteriana.

O próprio processo de colheita do líquido pode indicar alterações clínicas do paciente. Normalmente, o líquido é retirado por gotejamento, mas quando o fluxo do líquido acontece sob pressão é indicativo de aumento da pressão intracraniana (111).

O líquido normal tem aparência límpida e incolor, comparável à água destilada (3). O líquido turvo, ou leitoso está relacionado ao aumento de células leucocitárias, enquanto a aparência xantocrômica pode ser causada pela quebra de hemoglobina de eritrócitos infiltrados em oxihemoglobina ou bilirrubina. A contagem normal de leucócitos no líquido é normalmente de até cinco células/mm³ em adultos e até 20 células/mm³ em neonatos (112). A concentração de proteína no líquido de neonatos é de até 150mg/dL em condições normais, enquanto em crianças e em adultos os valores variam de 18 a 58mg/dL (113). A concentração de glicose no líquido varia entre os indivíduos, mas alguns autores consideram normais os valores acima de

40mg/dL (1, 2), ou 2/3 da concentração de glicose presente no soro colhido imediatamente antes da punção lombar (114).

A aparência do líquido é turva em pacientes com meningite bacteriana. Em casos não tratados, a contagem total de leucócitos é elevada, variando de 1.000 a 5.000 células/mm³, embora esta variação possa ser mais ampla indo de < 100 até > 10.000 células/mm³ (115). Esses pacientes geralmente têm predomínio de leucócitos polimorfonucleares (PMN) entre 80 e 95%. No entanto, cerca de 10% dos pacientes com meningite bacteriana aguda têm linfocitose (> 50% de linfócitos ou monócitos), o que é mais comum naqueles indivíduos com contagem de leucócitos inferior a 1.000 células/mm³ (116). A concentração de proteínas varia de 100 a 500mg/dL, podendo chegar a 1.000mg/dL (115). A concentração absoluta de glicose no líquido em pacientes com meningite bacteriana é < 40mg/dL, e a razão glicose líquido/soro é menor ou igual a 0,4 (117).

O líquido de pacientes com meningites virais é geralmente cristalino com contagem total de leucócitos menor que 500 células/mm³, embora este valor possa variar de 100 a 1.000 células/mm³ (4). A linfocitose é predominante no líquido desses pacientes, embora o predomínio de PMN possa ser observado nos estágios iniciais da doença (116). Os níveis de proteínas totais podem ser normais ou levemente aumentados, enquanto a concentração de glicose no líquido geralmente é normal ou levemente diminuída (4).

A administração de antibióticos previamente à punção lombar pode alterar consideravelmente os parâmetros citoquímicos do líquido (117). Por exemplo, os níveis de glicose geralmente são normalizados 24 horas após o início do tratamento. Outro fator que prejudica a interpretação do exame do líquido é o acidente de punção lombar, que introduz sangue no fluido espinhal. A ocorrência de acidente durante a punção lombar altera a contagem de leucócitos, a proteinorráquia e a glicorráquia (117).

Atualmente, têm sido propostos modelos multiparamétricos baseados em combinações de parâmetros clínicos e laboratoriais para definição de diagnóstico clínico da meningite (118-124). Nenhum critério clínico ou laboratorial considerado independentemente é capaz de diferenciar a meningite bacteriana da meningite viral com alta sensibilidade e boa especificidade. Assim, várias equipes propuseram sistemas de pontuação que consideram combinações de parâmetros clínicos e laboratoriais para definirem-se regras de decisão clínica. Porém, estes sistemas de

pontuação são dificilmente transponíveis entre diferentes hospitais e a distribuição da pontuação obtida aparece dispersa devido à variabilidade da apresentação clínica das meningites.

1.3.3.2 Identificação do agente etiológico causador de meningite

A identificação do agente etiológico da meningite é fundamental para auxiliar na escolha da terapia apropriada e para o rastreamento epidemiológico regional da doença. A cultura do líquido é considerada padrão-ouro para o diagnóstico diferencial das meningites (78, 125). Os meios de cultura rotineiramente usados para cultura do líquido são ágar sangue de carneiro a 5% e ágar chocolate. A incubação das placas deve ser feita por pelo menos 72h a 37°C em atmosfera contendo de 5 a 10% de CO₂ (11). Em pacientes com meningite bacteriana não tratada previamente com antibióticos, a cultura do líquido é positiva em 70-85% dos casos (126). No entanto, o resultado da cultura do líquido é demorado, o que obriga o uso de terapia empírica com antibióticos de largo espectro e, em alguns casos, a administração de antibióticos aos pacientes cuja etiologia se revela viral ao diagnóstico confirmatório. Em pacientes previamente tratados com antibióticos, a sensibilidade da cultura é significativamente diminuída (79).

Esfregações de líquido corados com a coloração de Gram também são usados para a identificação preliminar do agente etiológico da meningite bacteriana, sendo um método bem estabelecido e de baixo custo (78, 127). O teste de bacterioscopia por Gram positivo para diplococos gram-positivos sugere diagnóstico preliminar para *S. pneumoniae* (1). Organismos gram-negativos em forma de diplococos indicam *N.meningitidis*, enquanto os bacilos podem ser *H. influenzae*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (1).

O teste de aglutinação em látex tem sido usado para auxiliar no diagnóstico diferencial das meningites (3, 114). É um método rápido e de fácil execução que permite resultados em menos de 15 minutos (117). Os testes utilizam partículas de látex de poliestireno revestidas com anticorpos contra os antígenos bacterianos em solução de azida sódica a 0,1% como conservante. Estas partículas de látex

aglutinam macroscopicamente na presença de antígeno homólogo suficiente, sendo visualizadas a olho nu. O teste de aglutinação em látex é recomendado para casos suspeitos de meningite bacteriana com resultados negativos à cultura e bacterioscopia por Gram (117).

Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real (RT-PCR) tem sido avaliada para a identificação do agente etiológico das meningites em diversos fluidos biológicos (128, 129). Para detecção de *S. pneumoniae*, o alvo mais comum é o gene da pneumolisina (*ply*) por codificar uma proteína intracelular específica produzida por todos os sorotipos clinicamente relevantes (130-132). A PCR para o diagnóstico de *N. meningitidis* tem como alvo o gene *ctrA* que é único neste microrganismo, com porções gênicas altamente conservadas e comuns a todos os sorogrupos do meningococo. A limitação deste teste deve-se ao *primer* próximo à sequência terminal 5', região variável entre os diferentes sorogrupos do meningococo, o que compromete a sensibilidade do teste (133). O gene *bexA* codifica a proteína capsular presente em todas as cepas de *H. influenzae*, o que favorece sua identificação com alta sensibilidade (134). O uso da PCR é recomendado para casos suspeitos de meningite que apresentaram resultados negativos à cultura ou bacterioscopia por Gram (79, 117). A complexidade dos métodos baseado em PCR, ou RT-PCR dificulta a sua implementação pelos laboratórios hospitalares, mesmo em centros de referência em infectologia. O tempo necessário para a realização destes testes ainda não atendem a necessidade do diagnóstico rápido e “point-of-care”. Além disso, a eliminação rápida dos patógenos pelo sistema imune do hospedeiro limita a janela temporal para detecção dos ácidos nucleicos desses microrganismos.

1.4 Estado da arte da pesquisa de novos biomarcadores para as meningites

A participação de mediadores inflamatórios na patofisiologia das meningites é notável; por exemplo, as citocinas são capazes de iniciar e intensificar a resposta inflamatória do hospedeiro, precedendo o infiltrado de células polimorfonucleares no espaço subaracnoide. Por isso, diversos trabalhos têm proposto a utilização de citocinas e quimiocinas como marcadores para o diagnóstico diferencial entre as meningites bacterianas e virais e de prognóstico da doença.

Citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e IL-8 e TNF- α têm sido amplamente avaliadas para o diagnóstico diferencial entre as meningites bacteriana e viral, com resultados contraditórios (135-139). Na maioria dos estudos até hoje realizados, a concentração destas citocinas está consideravelmente aumentada no líquido ou soro de pacientes com meningite bacteriana em comparação com a meningite viral. Entretanto, a avaliação como marcador diagnóstico de cada citocina difere entre os trabalhos, possivelmente devido às variações do delineamento experimental relacionadas ao grupo etário estudado, processamento das amostras e número de pacientes de cada etiologia de meningite. Por exemplo, Vázquez e colaboradores (137) demonstraram que a IL-6 é um bom marcador para diagnóstico e prognóstico da meningite bacteriana, sendo que concentrações desta interleucina acima de 35-40pg/mL seriam capazes de diferenciar esta doença da meningite viral ou de indivíduos saudáveis com sensibilidade de 100% e especificidade de 95%. Todavia, outros trabalhos consideraram que a IL-6 não deve ser utilizada como marcador diferencial das meningites, devido a sobreposições das faixas de concentrações desta interleucina nos grupos de pacientes com meningite bacteriana, viral ou sem meningite (135, 136). Por exemplo, pacientes com meningite meningocócica apresentaram concentrações de IL-6 menores que 20pg/mL, enquanto pacientes com meningite viral apresentaram concentrações de IL-6 superiores a 50pg/mL (136). Estes resultados contrariam o ponto de corte proposto por Vázquez e colaboradores para distinção dos casos com meningite bacteriana a partir da dosagem de IL-6.

Outros trabalhos investigaram o papel de outras citocinas, como IL-1 β , IL-8 e TNF- α para o diagnóstico diferencial das meningites (140, 141). O TNF- α apresenta concentrações marcadamente superiores em pacientes com meningite bacteriana em comparação com a meningite viral (136, 142, 143). A concentração mínima detectada de TNF- α em pacientes com meningite bacteriana é pelo menos duas vezes superior à encontrada em pacientes com meningite viral ou indivíduos saudáveis (meningite bacteriana: 21,13pg/mL; meningite viral: 8,78pg/mL; controles: 1,37pg/mL) (136). Entretanto, concentrações divergentes desta citocina entre os pacientes com meningite bacteriana ou viral são relatadas em outros trabalhos, o que compromete o valor diagnóstico deste marcador (141, 142). Além disso, outras doenças inflamatórias do SNC causam o aumento considerável de citocinas no cérebro, como a esquizofrenia, Alzheimer e hemorragia subaracnoide, reduzindo a especificidade deste método diagnóstico (144-146). Por fim, a dosagem de citocinas é principalmente realizada por ensaios imunoenzimáticos, o que permite a detecção de quantidades mínimas de citocinas no líquido. Em contraste, a maior parte dos ambientes hospitalares não dispõe de recursos suficientes para a dosagem imunoenzimática de citocinas, o que limita a aplicação desta análise. Assim, a identificação de biomarcadores estáveis da resposta inflamatória do hospedeiro, a partir da proteômica, pode ser considerada uma alternativa promissora para o diagnóstico diferencial das meningites.

A concentração de lactato no líquido também tem sido proposta para diagnóstico diferencial das meningites. O lactato é um ácido hidroxicarboxílico que existe nos fluidos corporais como dois isômeros: D-lactato e L-lactato. Embora alguns trabalhos tenham avaliado a concentração dos isômeros para o diagnóstico diferencial da meningite (147, 148), a maioria dos estudos não distingue entre as duas formas (149-151). A concentração do lactato no líquido, assim como outros parâmetros citoquímicos, por exemplo, contagem total de leucócitos, varia de acordo com o agente etiológico causador da doença, com o tratamento prévio do paciente com antibióticos e com a faixa etária. Alguns estudos de meta-análise consideraram a dosagem do lactato um excelente marcador individual para o diagnóstico diferencial das meningites com sensibilidade e especificidade médias de 93 e 94%, respectivamente (149, 151). Entretanto, alguns trabalhos incluídos na avaliação por meta-análise não apresentam um diagnóstico definitivo de todos os pacientes com meningite e/ou definem pontos de corte com pouca aplicabilidade. A associação dos

dados clínicos e laboratoriais em modelos preditivos multiparamétricos resulta em aumento da sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da meningite. Desse modo, é razoável considerar que a concentração do lactato no líquido pode ser utilizada para auxiliar o diagnóstico diferencial das meningites em conjunto com os parâmetros citotóxicos clássicos do líquido (150).

1.5 Esquemas terapêuticos para as meningites

1.5.1 Meningites bacterianas

A escolha do antibiótico mais adequado para a meningite bacteriana depende do patógeno. No entanto, o início do tratamento não pode ser adiado até que a bactéria seja identificada devido à evolução rápida e devastadora da doença. Por isso, o tratamento normalmente se dá de forma empírica, baseando-se no conhecimento epidemiológico acerca das formas bacterianas prevalentes para cada grupo etário. Para a escolha dos antibióticos específicos para cada etiologia da meningite bacteriana deve ser utilizado o conhecimento atual sobre os padrões de susceptibilidade antimicrobiana de cada patógeno, sempre considerando que a resistência antimicrobiana é provável (117).

Na maioria dos casos de meningite bacteriana em crianças e adultos, o tratamento inicial é feito com cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima ou ceftriaxona) que possuem excelente atividade contra todas as cepas de Hib, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* (78, 111). Além disso, a adição de vancomicina tem sido avaliada para o tratamento de isolados de *S. pneumoniae* que se apresentam não susceptíveis às cefalosporinas (117, 150, 152). Em pacientes com 50 anos ou mais, a ampicilina deve ser administrada para cobertura adicional de *Listeria monocytogenes* que é prevalente nesse grupo etário (78).

O uso dos antibióticos bactericidas como as cefalosporinas causam a liberação de produtos da parede celular bacteriana, tais como endotoxinas, ácidos teicóicos e peptidoglicanos. Estes produtos favorecem a produção de mediadores inflamatórios como o TNF- α e a IL-1 associados ao pior prognóstico e aumento da severidade da meningite bacteriana (153-155). A atenuação da resposta inflamatória é essencial para a redução das consequências desta doença, como o edema cerebral, o aumento da pressão intracraniana, a alteração do fluxo sanguíneo cerebral e o dano neuronal (16, 156, 157). Para isso, terapias com adjuvantes têm sido propostas para atenuar a pleocitose, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzir a produção de iNOS (158-160).

Um dos principais adjuvantes utilizados para tratamento da meningite bacteriana é o corticosteroide dexametasona. A melhor indicação para o uso deste fármaco é no tratamento da meningite causada por *H. influenzae* (161). Diversos estudos clínicos consideram que o uso da dexametasona combinada aos antibióticos para o tratamento das meningites apresenta benefícios tanto em crianças quanto em adultos (161-165). Todavia, outros trabalhos questionam a capacidade desse adjuvante em reduzir as taxas de mortalidade e morbidade associadas às meningites (166-172). Em modelo experimental de meningite pneumocócica utilizando ratos infantis foi observado que o uso da dexametasona não previne o dano coclear devido à perda de neurônios do gânglio espiral (173, 174). Assim, o benefício da dexametasona para o tratamento das meningites é incerto e requer mais estudos para avaliação de seus efeitos como terapia adjuvante.

Compostos químicos com atividade inibitória de MMPs previnem o dano cerebral e coclear (36, 38). Em modelos experimentais de meningite bacteriana, o uso de inibidores de MMPs e/ou da enzima conversora de TNF- α (TACE) manteve a integridade da BHE, reduziu o dano neuronal no córtex e a mortalidade dos animais com meningite pneumocócica (38, 175, 176). A administração da doxiciclina em modelo experimental de ratos com meningite pneumocócica diminuiu a mortalidade e o dano no cérebro e na cóclea dos animais infectados (63). A doxiciclina é uma tetraciclina de segunda geração com boa penetração no SNC que possui atividade anti-inflamatória pela inibição da TACE. Esta enzima intensifica o processo inflamatório por meio da produção de TNF- α que, por sua vez, favorece a atividade das MMPs e a liberação de outras citocinas (177-179). A produção prejudicada de TNF- α devido à administração de doxiciclina atenua o quadro inflamatório exacerbado observado na meningite bacteriana (175).

O uso de fármacos potenciais sequestradores de espécies reativas no tratamento das meningites pode ser uma alternativa capaz de reduzir os danos neurológicos relacionados a esta doença. O uso de sequestradores de RNS, como o urato ou o ascorbato, em adição ao antibiótico ceftriaxona atenuou a resposta inflamatória do hospedeiro durante a meningite bacteriana (180). Além disso, esta terapia adjuvante contribuiu para a redução da pressão intracraniana dos animais em modelo experimental de meningite pneumocócica (181)

1.5.2 Meningites virais

O tratamento das meningites virais inclui a manutenção de fluidos e eletrólitos, a atenuação da dor e a observação clínica para verificar a presença de sequelas neurológicas e neuroendócrinas como convulsões, edema cerebral e síndrome da secreção inadequada do hormônio antidiurético (SIADH) (4). Etapas da replicação viral como a síntese proteica, o desencapsulamento do vírus e a ligação a receptores celulares do hospedeiro são potenciais alvos de drogas antivirais para o tratamento da meningite. Na meningite por enterovírus normalmente utilizam-se somente analgésicos e narcóticos para atenuação dos sintomas da doença. Apesar de não haver medicamentos específicos para o tratamento da meningite por enterovírus, o uso de imunoglobulina sérica e do antiviral pleconaril têm sido avaliados (66). No entanto, a adoção da imunoglobulina para o tratamento da meningite viral ainda não é bem esclarecida, e por isso, não recomendada.

O antiviral aciclovir é utilizado para o tratamento das meningites por herpes simplex vírus e por varicela zoster. Este fármaco é seletivamente metabolizado por células do organismo infectadas pelo vírus e seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da DNA polimerase impedindo a síntese do DNA viral. O aciclovir não é tóxico para os pacientes, embora ocorra um acúmulo limitado desse fármaco nos rins devido à sua baixa solubilidade na urina (182). A administração de aciclovir no tratamento da meningite por herpes está associada à redução da severidade da doença e mortalidade em adultos e crianças, inclusive neonatos (183-186). Por outro lado, apesar do tratamento com aciclovir ser eficaz em meningite por varicela zoster, o tempo de hospitalização desses pacientes pode ser superior a quatro vezes em comparação àqueles que não receberam este fármaco (de 5 para 21 dias) (187).

1.6 A utilização da abordagem proteômica para a pesquisa de biomarcadores e de novos alvos terapêuticos

A proteômica pode ser definida como um estudo em larga-escala das características proteicas, tais como os níveis de expressão, as modificações pós-traducionais e as interações com outras moléculas para obter uma visão geral dos processos celulares relacionados às proteínas (188). O surgimento de novas tecnologias proteômicas, particularmente a evolução da eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas de alta resolução tem aprimorado consideravelmente a caracterização proteica dos fluidos biológicos. O uso das metodologias proteômicas atuais permite que a caracterização de proteomas inteiros seja um objetivo real. Por meio da análise de perfis proteicos de indivíduos saudáveis e doentes, a proteômica clínica tem sido capaz de revelar, identificar e quantificar novos biomarcadores capazes de auxiliarem no diagnóstico diferencial, além de novos alvos terapêuticos para diversas doenças, inclusive do SNC, como meningite, Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (189-194).

O metabolismo de uma célula, ou de um organismo é, geralmente, regulado por proteínas que agem em vias definidas como cascatas de interações entre proteínas, metabólitos, íons e genes. A proteômica funcional possibilita o entendimento de como essas interações contribuem para a regulação dos principais eventos biológicos (195, 196). Por sua vez, o conhecimento detalhado das interações proteína-proteína ativas no interior da célula, tanto em estado normal quanto patológico, é fundamental para a identificação de novos alvos terapêuticos para o controle de uma doença (195).

Poucos estudos proteômicos têm investigado marcadores biológicos para o diagnóstico diferencial das meningites bacterianas e virais, embora os resultados encontrados sejam relevantes. Jesse e colaboradores (197) identificaram seis potenciais biomarcadores para a diferenciação entre meningite bacteriana, sem distinção do agente etiológico, e viral em amostras de líquido. Dentre estas, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) foi validada por ensaio imunoenzimático e observaram-se valores médios aumentados dessa proteína no líquido de pacientes com meningite bacteriana em comparação a pacientes com meningite viral, embora os valores de sensibilidade e especificidade não tenham sido divulgados. A relevância diagnóstica de GFAP associada às meningites necessita maior investigação antes de poder ser aplicada clinicamente. A proteína GFAP é um

marcador bem estabelecido de ativação de micróglia (198), sendo que durante o dano celular por trauma ou doença, como a meningite bacteriana, a micróglia produz maior quantidade de GFAP. Goonetilleke e colaboradores (199) analisaram perfis proteicos de líquido de pacientes adultos com meningite pneumocócica que sobreviveram ou não à doença. As proteínas mais expressas em pacientes que evoluíram para óbito devido à meningite, tais como β -2-glicoproteína I, proteína carreadora de soluto 25 membro 16 e fator de estimulação (*tau* variante) foram sugeridas como marcadores de severidade da doença. No entanto, nenhum trabalho até hoje comparou os perfis proteicos do líquido de pacientes com as três formas epidemiologicamente mais relevantes de meningite (pneumocócica, meningocócica e viral) e de indivíduos normais. A investigação de biomarcadores da resposta inflamatória de pacientes com meningite pode revelar marcadores proteicos estáveis cuja liberação no líquido prossegue após a eliminação do patógeno pela antibioticoterapia, permitindo sua identificação em distintos estágios da doença.

O uso da proteômica pode contribuir tanto para a identificação de alvos proteicos úteis para o diagnóstico clínico precoce da doença, bem como para a determinação de vias metabólicas ou de sinalização diferencialmente reguladas em resposta às meningites e que contenham proteínas candidatas a novos alvos terapêuticos.

2 JUSTIFICATIVA

A meningite bacteriana é uma doença com progressão rápida e alta taxa de mortalidade que, todavia, pode ser curada com a administração imediata de antibióticos adequados em algumas situações, associados a anti-inflamatórios. A antibioticoterapia correta e rapidamente administrada é primordial para que o paciente com meningite bacteriana não sofra complicações neurológicas graves que muitas vezes evoluem para sequelas permanentes, como surdez e retardo mental ou para óbito. Entretanto, as taxas de mortalidade e morbidade associadas às meningites bacterianas permanecem elevadas. A escolha do esquema terapêutico requer que o diagnóstico diferencial seja feito rapidamente e com alta especificidade e sensibilidade. Entretanto, os métodos diagnósticos disponíveis são limitados de modo que, em grande parte dos casos, não há definição do agente etiológico, o que obriga ao tratamento empírico. Isto se deve principalmente ao tratamento prévio e inadequado dos pacientes com antibióticos antes da hospitalização, o que acontece em 30 a 50 % dos casos. Uma importante consequência do tratamento empírico ocorre quando pacientes com meningite viral são tratados com antibióticos e anti-inflamatórios. A atenuação da resposta inflamatória desses pacientes pode agravar a doença. Além disso, aumentam-se os riscos associados ao uso indevido de antibióticos e os custos com hospitalizações.

Os métodos de detecção dos patógenos baseados na PCR seriam uma alternativa interessante, principalmente para o diagnóstico de meningite viral, mas a complexidade da técnica tem inviabilizado a sua utilização na maioria dos hospitais. Além disso, a eliminação rápida dos patógenos pelo sistema imune do hospedeiro reduz a janela temporal para detecção dos ácidos nucleicos desses vírus ou bactérias. No entanto, mesmo após a eliminação dos patógenos do SNC, a inflamação persiste. Por isso, formulamos a hipótese de que o proteoma comparativo do líquido de pacientes afetados por diferentes formas de meningite pode revelar biomarcadores e novos alvos terapêuticos para as formas de meningite mais epidemiologicamente relevantes.

Neste contexto, o presente trabalho propõe a identificação de marcadores proteicos da resposta inflamatória do hospedeiro para o diagnóstico diferencial das formas mais frequentes de meningite bacteriana e viral. Como a maioria do conteúdo

proteico presente no líquido durante a meningite é constituído de proteínas da resposta imune do hospedeiro, esta estratégia é mais viável do que a investigação de proteínas do patógeno. Além disso, ainda que haja erradicação do patógeno, a reação inflamatória do hospedeiro se mantém no curso da doença, aumentando a janela temporal para o diagnóstico diferencial da meningite através da detecção de biomarcadores da resposta imune.

Por fim, a análise dos perfis proteicos do líquido de pacientes com meningite, à luz das redes de interações proteicas já descritas na literatura biomédica, pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos patofisiológicos associados com cada etiologia de meningite estudada, possibilitando a formulação de hipóteses sobre novos alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar biomarcadores presentes no líquido humano capazes de diferenciar os pacientes com meningite bacteriana ou viral de indivíduos sem infecção no sistema nervoso central e formular hipóteses sobre novos alvos terapêuticos para as formas malignas de meningite.

3.2 Objetivos específicos

Analisar as diferenças qualitativas entre os perfis proteicos do líquido de pacientes com meningite a fim de identificar proteínas específicas da resposta inflamatória do hospedeiro para cada agente etiológico que possam compor um modelo preditivo para o diagnóstico diferencial das meningites pneumocócica, meningocócica e viral;

Analisar a distribuição, no interatoma humano, das proteínas associadas às meningites pneumocócica, meningocócica e viral a fim de formular hipóteses sobre os mecanismos patofisiológicos das formas malignas de meningite e sugerir novos alvos terapêuticos para a prevenção da mortalidade e morbidade associadas a essas formas da doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da população selecionada para o estudo proteômico comparativo

Este projeto foi aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Processos nos. 25000.140699/2005-93 e 25000.199054/2008-18). Os pacientes, ou seus responsáveis legais, foram convidados a participar do estudo e assinaram um termo de consentimento esclarecido.

Para a análise comparativa do proteoma de líquido utilizando géis bidimensionais foram selecionados 18 pacientes com meningite pneumocócica, meningite meningocócica ou meningite viral e seis indivíduos controles (**Tabela 1**). Os pacientes foram atendidos no hospital Giselda Trigueiro (Natal/ RN) ou no Hospital Infantil João Paulo II – FHEMIG (Belo Horizonte/ MG) e submetidos à punção líquórica lombar. Imediatamente após a colheita do líquido, as amostras foram centrifugadas a 2.000g por cinco minutos para separação de células e os sobrenadantes foram congelados a -20°C nos laboratórios dos hospitais até serem transferidos para a Plataforma de Proteômica PDTIS – FIOCRUZ, subunidade Eletroforese 2D – BH (RPT-02D), em Belo Horizonte, onde ficaram estocados a -80°C até serem analisados. Amostras com mais de 250 eritrócitos/μL e tempo de processamento superior a 6 horas foram excluídas deste estudo.

Foram analisados adicionalmente os resultados de exames dos parâmetros citotóxicos do líquido, a saber: contagem total e diferencial de leucócitos, proteínas totais e glicose, do grupo de pacientes que compõem este estudo para comparação com dados pré-estabelecidos na literatura científica. Estes exames foram feitos nos laboratórios dos hospitais parceiros que disponibilizaram as amostras de líquido para o projeto e os resultados foram coletados a partir da revisão dos prontuários dos pacientes.

O diagnóstico confirmatório das meningites bacterianas se deu pela detecção dos patógenos no líquido, ou no sangue, por um ou mais dos seguintes testes: cultura, bacterioscopia por Gram, ou aglutinação em látex. O diagnóstico de

meningite viral foi feito por exclusão das formas bacterianas de meningite quando havia quadro clínico de meningite com resultados de cultura, bacterioscopia por Gram e aglutinação de látex negativos, mas com contagem de leucócitos levemente aumentada (> 50 células), níveis de proteínas podendo estar levemente aumentados, ou normais (normal: 15 a 45mg/dL) e glicose normal ou levemente diminuída (normal: 60mg/dL). O grupo controle foi formado por indivíduos sem infecção no SNC, infecções sistêmicas, doenças psiquiátricas ou neurodegenerativas atendidos por suspeita de meningite, mas cuja doença foi descartada pelo diagnóstico confirmatório e pelos valores de parâmetros citoquímicos normais.

Tabela 1: Caracterização da população selecionada para o estudo proteômico comparativo

DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS								DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS						
	Idade	Sexo	H. IJPII	H. GT	Sinal clínico	Febre	Sinais meníngeos	Leucócitos	% PMN	Proteínas	Glicose	Cultura	Gram	Látex
Pacientes														
MP														
1	9a	M	x		vômito	(+)	(+)	5.600	80	441	71	(+)	N/A	N/A
2	22a	M		X	N/A	N/A	N/A	1.438	90	185	26	N/A	(+)	N/A
3	13a	M		X	N/A	N/A	N/A	4.400	93	186	20	(+)	(+)	(+)
4	23a	M		X	N/A	N/A	N/A	645	95	335	2,5	(+)	(+)	N/A
5	36a	M		X	N/A	N/A	N/A	960	87	474	1,5	(+)	(+)	N/A
6	2a	F	x		vômito; cefaleia	(+)	(+)	240	92	110	1	(+)	(+)	(+)
MM														
1	13a	F	x		vômito	(+)	(+)	72	5	66	41	N/A	(+)	N/A
2	5m	F	x		vômito	(+)	(+)	2.560	44	187	3	(+)	(+)	(+)
3	12a	F	x		vômito	(+)	(+)	19.500	96	461	0	(+)	N/A	N/A
4	5a	M	x		vômito	(+)	(+)	6.800	95	202	53	N/A	N/A	(+)
5	8a	F		X	N/A	N/A	N/A	13.500	94	80	2	(-)	(+)	(-)
6	11a	F	x		vômito	(+)	(+)	120	94	281	48	(+)	(+)	N/A
MV														
1	4a	F	x		vômito	(+)	(+)	500	30	31	49	N/A	(-)	(-)
2	4a	M	x		(-)	(+)	(-)	2	8	18	51	N/A	(-)	(-)
3	6a	F	x		vômito; cefaleia	(+)	(+)	44	56	36	43	(-)	(-)	(-)

	Idade	Sexo	H. IJP II	H. GT	Sinal clínico	Febre	Sinais meníngeos	Leucócitos	% PMN	Proteínas	Glicose	Cultura	Gram	Látex
4	8a	M	x		vômito; cefaleia	(+)	(+)	33	73	38	50	N/A	(-)	(-)
5	3a	M	x		mal- estar	(-)	(+)	53	10	29	47	N/A	N/A	(-)
6	11m	F	x		vômito	(+)	N/A	21	60	32	57	(-)	(-)	N/A
CTRL														
1	7a	M	x		vômito	(+)	(+)	6	54	35	72	N/A	N/A	N/A
2	3a	M	x		mal- estar	(+)	(-)	9	94	20	50	N/A	N/A	N/A
3	33a	M		X	N/A	N/A	N/A	2	80	30	40	(-)	N/A	N/A
4	2a	M	x		(-)	(-)	N/A	2	13	21	62	N/A	N/A	N/A
5	11m	F	x		vômito	(+)	(-)	1	7	26	58	(-)	(-)	N/A
6	5m	F	x		(-)	(+)	N/A	2	0	24	51	(-)	(-)	N/A

MP: Meningite pneumocócica; MM: Meningite meningocócica; MV: Meningite viral; CTRL: Controle; H. IJP II: Hospital Infantil João Paulo II; H.GT: Hospital Giselda Trigueiro; a: anos; m: meses; M: masculino; F: feminino; (+): positivo; (-): negativo; N/A: ignorado; Gram: bacterioscopia por Gram; Leucócitos (células/mm³); Proteínas e Glicose: mg/dL; dados de cultura, Gram e látex: no líquido.

4.2 Processamento das amostras de líquido

4.2.1 Concentração das amostras por precipitação de proteínas

As proteínas das amostras de líquido selecionadas para este estudo foram precipitadas com acetona (Merck, Dramstadt, Alemanha). As soluções foram preparadas adicionando-se 1,2mL de acetona gelada a 300µL de líquido, seguido de incubação a -20°C por 16h. Amostras de líquido de pacientes com meningite bacteriana têm maior concentração proteica em comparação com amostras virais e controles. Por isso, para estes dois últimos grupos de pacientes foram utilizados 600µL de líquido. A proporção de 4:1 volumes de acetona e líquido foi mantida para todas as amostras. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000g, a 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e os tubos com os precipitados foram mantidos à temperatura ambiente para evaporação completa da acetona. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 15µL de água Milli-Q (UltraPure Millipore, MA, EUA).

4.2.2 Depleção de albumina e IgG do líquido de pacientes com meningite e controles

A albumina e a imunoglobulina G (IgG) estão proporcionalmente em maior concentração em diversos fluidos biológicos em comparação às demais proteínas, inclusive no líquido, e, por isso, são consideradas grandes interferentes em análises proteômicas destes fluidos. Portanto, foi realizada a depleção destas proteínas nas amostras previamente concentradas utilizando o kit *Albumin & IgG Depletion SpinTrap*[™] – GE (Healthcare, Uppsala, Suécia). O kit emprega anticorpo monoclonal anti-albumina, e proteína G de streptococcus imobilizados covalentemente à

sepharose o que permite que estas proteínas sejam removidas da amostra de forma rápida e seletiva. Para cada amostra de líquido previamente concentrada com acetona e ressuspensa em 15µL de água Milli-Q foram adicionados 85µL de tampão contendo fosfato de sódio a 20mM e cloreto de sódio a 0,15M, pH 7,4. O volume final de 100µL por amostra foi aplicado à coluna de *sepharose* seguindo as instruções do fabricante. Os 300µL de eluato foram concentrados 20X por nova precipitação com acetona, como descrito no item 2.1, seguida de ressuspensão do precipitado em 15µL de tampão de reidratação IEF (Ureia a 8M, Tioureia a 2M, CHAPS a 4%).

4.2.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras de líquido em estado bruto e após depleção das proteínas hiperabundantes e segunda concentração foi feita de acordo com o método descrito por Bradford (200), utilizando-se o kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, CA, EUA). O kit é composto pelo corante Coomassie Blue G-250, que em sua forma aniônica se liga especificamente aos resíduos de aminoácidos arginina, lisina e histidina das proteínas. A absorvância máxima do complexo corante-proteína ocorre a 595nm. O procedimento foi realizado em placa de 96 poços utilizando-se uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA, Bio-Rad, CA, EUA) diluída em tampão de reidratação IEF, contendo 10 pontos, em duplicata, distribuídos entre 0,012µg/µL a 0,7µg/µL. A diluição das amostras de líquido para quantificação depende da condição da mesma (em estado bruto, ou após depleção) e da etiologia de meningite (**Tabela 2**). Foram aplicados em cada poço 10µL de amostra, ou do ponto da curva padrão, e 200µL do reagente de Bradford diluído 1:4. Após homogeneização, os valores de absorvância a 595nm foram obtidos em um leitor de microplacas (*SpectraMax 190 Absorbance Microplate Reader*, Molecular Devices Inc., EUA). As concentrações proteicas foram calculadas lançando-se os valores de absorvância na equação da reta derivada da curva padrão.

Tabela 2: Diluição de amostras de líquido para quantificação de proteínas

	MP	MM	MV	CTRL
Amostras				
Estado bruto	1:35 - 1:50	1:20 - 1:50	1:10	1:2 - 1:5
Após depleção	1:35 - 1:50	1:10 - 1:35	1:5	1:5 - 1:10

As diluições das amostras de líquido dos pacientes, excetuando aqueles com meningite viral, foram empiricamente estimadas a partir da turbidez das amostras observadas a olho nu. MP: Meningite pneumocócica; MM: Meningite meningocócica; MV: Meningite viral; CTRL: controle.

4.2.4 Eletroforese de proteínas

4.2.4.1 Eletroforese Unidimensional – SDS-PAGE

As proteínas do líquido foram separadas por eletroforese unidimensional em géis desnaturantes SDS-PAGE de acordo com o método de Laemmli (1970) (201), utilizando o sistema Mini-Protean II (Bio-Rad, CA, EUA). Foi utilizado 0,04µg de padrão de massa molecular na faixa de 6,5 a 200kDa (*Broad Range Molecular Weight*, Bio-Rad, CA, EUA) aplicado na primeira canaleta do gel. Para cada amostra, foi aplicado nas canaletas do gel o volume correspondente a 0,5µg de proteína, independente da etiologia e da condição de processamento (em estado bruto ou após depleção). Às amostras foi acrescentado o mesmo volume de tampão de amostra 2X [Tris-HCl a 0,06M, pH 6,8, SDS a 2% (m/v), β-mercaptoetanol a 5% (v/v), glicerol a 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,025% (m/v)]. Em seguida, as misturas foram aquecidas a 96°C por 5 minutos e transferidas para o gelo. Após o resfriamento, o volume total de cada amostra foi aplicado na respectiva canaleta em gel de poli(acrilamida). A voltagem inicial utilizada foi de 7,8V/cm até que as amostras atravessassem o gel de concentração a 4% de acrilamida e entrassem no gel de separação a 12% de acrilamida. Posteriormente, a voltagem foi elevada para 15,6V/cm por aproximadamente 1,5h, ou até que o corante atingisse o final do gel. O tampão de corrida utilizado é composto de Tris base a 0,025M, glicina a 192mM e

SDS a 0,1% (m/v). Em seguida, os géis foram fixados e corados com nitrato de prata, como descrito adiante no item 2.5.1.

4.2.4.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

4.2.4.2.1 Focalização isoeletrica (primeira dimensão)

A separação de proteínas na primeira dimensão por focalização isoeletrica foi realizada de acordo com seu ponto isoeletrico em fitas de gradiente imobilizado de pH (IPG) de 7cm, pH 3-10NL (*ReadyStrip™ IPG Protean IEF* (Bio-Rad, CA, EUA). As proteínas do líquido foram separadas. Para cada amostra do presente trabalho (e suas réplicas técnicas) foi aplicado 0,5µg de proteína em uma fita de IPG. Os experimentos de 2-DE destinados a identificação de proteínas por espectrometria de massas foram feitos com *pools* de amostras contendo 10, 40 e 100µg de proteína.

Amostras de proteínas do líquido foram solubilizadas em tampão IEF [Ureia a 8M, Tiourea a 2M, CHAPS a 4% (m/v), azul de bromofenol a 0,0025% (m/v), anfólito *Bio-Lyte®* 3-10 (Bio-Rad, CA, EUA) a 0,2% (v/v) e DTT a 65mM] para um volume final de 125µL. A solução foi mantida sob agitação por uma hora à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 20.000g, à temperatura ambiente, para separação do material não solubilizado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aplicado ao longo de uma canaleta da bandeja de focalização isoeletrica entre os eletrodos. Em seguida, as fitas de IPG foram colocadas diretamente em contato com as amostras, com a face da fita recoberta pelo gel voltada para baixo e sem que houvesse bolhas de ar sob a fita, e mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente para a absorção da amostra. Após a incubação, adicionou-se óleo mineral. As fitas de IPG foram submetidas à reidratação e à focalização isoeletrica no equipamento PROTEAN IEF Cell (BioRad, CA, EUA) a 20°C, com uma corrente máxima de 50µA por fita de IPG nas condições descritas a seguir: 1) reidratação passiva por 4 horas; 2) reidratação ativa a 50V por 12 horas; 3) passo 1: 500V, 30 minutos; 4) passo 2: 1.000V, 30 minutos; 5) passo 3: 4.000V, 1

hora e; 6) passo 4: 4.000V até 16.000V / h. As fitas de IPG focalizadas foram utilizadas imediatamente para separação das proteínas pela segunda dimensão por SDS-PAGE.

4.2.4.2.2 Equilíbrio das fitas de IPG

O equilíbrio das fitas de IPG após a focalização isoeétrica confere às proteínas uma carga residual negativa e mantém as pontes dissulfeto reduzidas, para separação das proteínas por peso molecular (segunda dimensão) em SDS-PAGE. Para isso, as proteínas foram reduzidas e alquiladas durante o equilíbrio. Para redução das pontes dissulfeto, o tampão usado era composto de Ureia a 6M, glicerol a 30% (v/v), SDS a 2% (m/v), Tris-HCl a 50mM pH 8,8, azul de bromofenol a 0,001% (m/v) e DTT a 130mM, e, para alquilar as proteínas e prevenir sua reoxidação durante a eletroforese, utilizou-se o mesmo tampão descrito acima mas, ao invés de DTT, adicionou-se iodoacetamida a 135mM. Durante as duas etapas, a bandeja de equilíbrio contendo as fitas de IPG foi mantida sob lenta agitação à temperatura ambiente, por 10 minutos.

4.2.4.2.3 SDS-PAGE (segunda dimensão)

A separação das proteínas pela segunda dimensão foi realizada por SDS-PAGE a 12% de acrilamida, como descrito por Laemmli (1970) (201). As fitas de IPG previamente equilibradas foram colocadas sobre a borda superior do gel de poliacrilamida, contendo apenas o gel de separação de proteínas, em sistema Mini-Protean II (Bio-Rad, CA, EUA) e seladas com agarose a 0,5% (m/v) contendo 0,0005% de azul de bromofenol. Foi utilizado 0,04µg de padrão de massa molecular na faixa de 6,5 a 200kDa (*Broad Range Molecular Weight*, Bio-Rad, CA, EUA) aplicado em papel de filtro que foi posicionado no canto esquerdo da borda superior do gel e selado juntamente com a fita de IPG. Na primeira etapa da eletroforese, a voltagem foi mantida em 7,8V/cm durante 30 minutos para que as proteínas

penetrassem no gel de separação. Posteriormente, o sistema foi mantido a 15,6V/cm aproximadamente por 1,5h, ou até que o corante atingisse a borda inferior do gel. Géis bidimensionais contendo 0,5µg de proteína foram corados com nitrato de prata, enquanto géis cujos *spots* seriam submetidos à análise por espectrometria de massas foram corados com Azul de Coomassie Coloidal G-250, como descrito a seguir.

4.2.5 Coloração dos géis de poliacrilamida

4.2.5.1 Impregnação por nitrato de prata

Os géis foram fixados primeiramente com solução composta por etanol a 40% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v) por 1,5h e, em seguida, com solução aquosa de etanol a 20% (v/v) por 10 minutos. Em seguida, os géis foram lavados com água Milli-Q por 10 minutos. A sensibilização foi feita com solução de ditionito de sódio 0,3g/L, por um minuto, seguida de duas lavagens com água Milli-Q pelo mesmo tempo. Os géis foram, então, corados com solução de nitrato de prata a 2g/L, por 40 minutos, e lavados por aproximadamente 30 segundos com água Milli-Q. Os géis foram revelados com solução de carbonato de potássio a 30mg/mL, tiosulfato de sódio a 10mg/mL e formaldeído a 37% (v/v) por aproximadamente cinco minutos. O bloqueio da revelação foi feito com solução de Tris-base a 40mg/ml e ácido acético a 2% (v/v) por 30 minutos. Os géis foram armazenados em solução de etanol a 20% (v/v) a 4°C. Todas as etapas foram realizadas sob agitação constante, a temperatura ambiente.

4.2.5.2 Coloração por Azul de Coomassie Coloidal G-250

Os géis foram fixados em solução aquosa de etanol a 30% (v/v) e ácido ortofosfórico a 2% (v/v) por 1,5h, sendo a solução trocada a cada 30 minutos. Em

seguida, foram feitas três lavagens de 10 minutos com solução de ácido ortofosfórico a 2% (v/v). A coloração foi feita em solução contendo ácido ortofosfórico a 2% (v/v), etanol a 18% (v/v) e sulfato de amônio a 15% (m/v) por 30 minutos e, posteriormente, adicionou-se a esta solução 1% de seu volume de uma solução concentrada de Azul de Coomassie Coloidal G-250 a 2% (m/v), incubando-se em seguida por 24 a 72 horas. O excesso de corante foi removido com etanol a 20% (v/v) e os géis foram armazenados em solução de sulfato de amônio a 12% (m/v). Todas as etapas foram realizadas sob agitação constante, a temperatura ambiente.

4.2.6 Análise das imagens dos géis bidimensionais

As imagens de géis uni e bidimensionais foram capturadas utilizando o densitômetro GS-800 (Bio-Rad, CA, EUA). O *software PDQuest 8.0.1* (Bio-Rad, CA, EUA) foi usado para comparações entre as imagens dos géis bidimensionais. O tamanho e a orientação da imagem de cada gel foram ajustados com as ferramentas de recorte e rotação disponíveis no menu de imagem. Os *spots* proteicos foram detectados seguindo-se as instruções do manual do *software PDQuest*. A ferramenta *spot-detection wizard* automatiza o processo de seleção de parâmetros mais adequados para detecção dos *spots* proteicos. Estes parâmetros foram ajustados até que a maioria (95%) dos *spots* fosse detectada no gel. Os dados do objeto (*spots*) são compostos de *pixels* individuais. A intensidade de um *spot* é a soma das intensidades de todos os *pixels* que formam aquele *spot*. Se a intensidade média do *spot* é maior que a do *background*, então o objeto é detectado como um *spot*. Após a etapa de detecção, a imagem original foi filtrada e suavizada criando-se imagens gaussianas para melhor definição do mapa proteico. Toda a análise foi realizada utilizando-se imagens gaussianas. Cada *matchset* era composto pelo conjunto de imagens de géis bidimensionais de cada etiologia de meningite estudada, ou controles. Para criação do *matchset*, os *spots* de diferentes géis da mesma etiologia foram alinhados e incluídos em uma imagem sintética (gel *master*) que agrupa as informações disponíveis acerca dos *spots* presentes no conjunto de géis de uma mesma análise.

Ao todo, doze géis de cada etiologia de meningite (representando seis indivíduos e suas duplicatas técnicas) foram comparados entre si e confrontados com os demais géis das outras etiologias de meningite e do grupo controle, também formado por doze géis, buscando-se *spots* para compor os subconjuntos interseção e os conjuntos união de cada grupo. O **subconjunto interseção** ($\cap$) é formado pelos *spots* presentes em todos os 12 géis contendo as amostras de seis indivíduos de um dado grupo e o **conjunto união** ($\cup$) é formado pelos *spots* observados em pelo menos um dos 12 géis com as amostras de seis indivíduos de um dado grupo. Posteriormente, esses dados foram utilizados para a composição de uma matriz de presença, ou ausência, de todas as proteínas identificadas por espectrometria de massas em cada grupo de meningite ou controle. Esta matriz foi utilizada para a seleção das proteínas candidatas a biomarcadores para o diagnóstico diferencial das meningites.

4.3 Identificação por espectrometria de massas

4.3.1 Excisão dos *spots*

Os *spots* selecionados para identificação por espectrometria de massas foram excisados manualmente dos géis com o auxílio de ponteiros universais. Depois de excisados, os *spots* foram transferidos para microtubos siliconizados de 0,5mL (Axygen, Inc., CA, EUA) pré-lavados com metanol, água e novamente metanol. Estas lavagens permitiram a eliminação de resíduos de plásticos presentes nos microtubos que frequentemente são verificados como interferentes em espectros de massas. Os microtubos contendo *spots* excisados foram armazenados a 4°C até a etapa de digestão trípica, descrita a seguir.

4.3.2 Digestão trípica em gel de poliacrilamida

Antes da digestão com tripsina, os *spots* proteicos foram descorados em solução de acetonitrila a 50% (v/v) e bicarbonato de amônio a 25mM, pH 8,0 em duas lavagens de 15 minutos, sob agitação constante em vortex, intercaladas por uma lavagem por 16h sem agitação. Em seguida, os pedaços de gel foram desidratados em acetonitrila 100%. Após a remoção da acetonitrila, os pedaços de gel foram secados em *Speed Vac* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 15 minutos.

As proteínas em gel foram digeridas com tripsina de acordo com protocolo de Shevchenko e colaboradores (202), com modificações. A tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry*, Promega, WI, EUA) foi ressuspensa em ácido acético a 50mM para a concentração de 1µg/µL e diluída em solução de bicarbonato de amônio a 40mM e acetonitrila a 10% (v/v) para concentração final de 20µg/mL. Os pedaços de gel foram incubados com 20µL dessa solução por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 50µL de bicarbonato de amônio a 40mM e acetonitrila a 10% (v/v) e a digestão das proteínas foi feita por 16h a 37°C. A solução resultante da digestão foi transferida para um novo tubo de 0,5mL e os peptídeos foram extraídos com 30µL de solução de ácido fórmico a 5% (v/v) e acetonitrila a 50% (v/v) por 30 minutos, com agitação constante. A solução com os peptídeos extraídos foi removida e transferida para o tubo contendo a solução resultante da digestão. A extração foi repetida e, posteriormente, as soluções contendo os peptídeos extraídos de um mesmo *spot* foram reunidas em um mesmo tubo. As amostras foram concentradas para 10µL em *Speed Vac* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Os peptídeos resultantes da tripsinização foram dessalinizados através da micropurificação em *ZipTip Pipette Tips* ®C₁₈ (Millipore, MA, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

4.3.3 Análise das proteínas por espectrometria de massas

Os peptídeos gerados a partir da digestão trípica foram analisados pela técnica de espectrometria de massas de desorção a *laser* acoplado a medida de tempo de voo (MALDI-ToF-ToF) utilizando-se o analisador de massas *Proteomics 5800* (AB Sciex) que pertence à Plataforma de Proteômica, subunidade Espectrometria de Massa – RJ (RPT02A) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ – RJ. Os peptídeos foram co-cristalizados com 0,3µL de matriz composta por ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico a 10mg/mL (Sigma, MO, EUA) em ácido trifluoro acético a 0,1% (m/v), acetonitrila a 50% (v/v) diretamente sobre uma placa de MALDI. A matriz é um composto que auxilia na ionização suave da amostra quando excitada pelo agente ionizador (*laser*). Os dados das análises de MS (peptídeos trípticos) e MS/MS (fragmentos de colisão) foram adquiridos com um *laser* com taxa de repetição de 1kHz. O número de tiros utilizado foi 2.000 para os modos MS e MS/MS. Os doze picos mais intensos, cuja relação sinal-ruído era superior a dois, foram selecionados como precursores para aquisição MS/MS, excetuando os picos oriundos de autólise da tripsina, ou provenientes da matriz. Também foram excluídos dessa análise fragmentos trípticos conhecidos da queratina. A calibração externa no modo MS foi realizada utilizando-se uma mistura de padrões de massa molecular de peptídeos contendo des-Arg1-Bradicinina ($m/z = 904,47$), angiotensina I ($m/z = 1296,69$), Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1570,68$) e de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (7-38) ($m/z = 3657,93$). Espectros MS/MS foram externamente calibrados utilizando-se massas conhecidas dos fragmentos iônicos observados no espectro MS/MS de Glu1-fibrinopeptídeo B.

4.3.4 Identificação de proteínas a partir dos espectros de massas

Os espectros de massas dos peptídeos gerados pela digestão com tripsina (MS) e os dados de fragmentação dos peptídeos (MS/MS) foram utilizados para a

identificação de proteínas por busca em banco de dados através do *software* MASCOT, disponível em versão *web* (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido; www.matrixscience.com). As análises foram feitas utilizando o banco de dados de proteínas não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) restrito para *Homo sapiens* em 20 de julho de 2012. Foram toleradas no máximo duas falhas de clivagens para peptídeos semi-trípticos e uma variação de massa dos peptídeos de 100ppm e 0,3Da para MS/MS. A carga do peptídeo foi de +1. Como modificações pós-traducionais variáveis, que podem estar presentes ou não na sequência peptídica, foram permitidas carbamidometilação de cisteína (C), oxidação de metionina (M), deamidações de asparagina (N) e glutamina (Q) e formação de piroglutamato na porção N-terminal de glutamina (Gln-> pyro Glu).

4.4 Previsão da localização celular das proteínas identificadas

Utilizando-se a versão *web* do *software* SherLoc 2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc2>) foi feita a previsão da localização celular das proteínas identificadas por espectrometria de massas. SherLoc 2 integra previsões de localização celular proteica a partir de quatro classificadores baseados na sequência de aminoácidos e um classificador baseado em mineração de textos da literatura científica da proteína de entrada. Os classificadores baseados em sequência utilizam quatro propriedades determinantes da separação intracelular de proteínas: 1) peptídeo terminal alvo; 2) sequência com sinal âncora; 3) composição de aminoácidos e, 4) presença ou ausência de 43 motivos obtidos previamente dos bancos de dados PROSITE (203) e NLSdb (204, 205). O classificador baseado em mineração de textos utiliza o conjunto de títulos e resumos de artigos científicos disponíveis no Pubmed associados com o nome e Swiss Prot ID de cada proteína. Cada classificador do tipo Máquinas de Vetores de Suporte (*support vector machine* – SVM) faz uma previsão da localização celular pela composição de um vetor que indica a probabilidade da proteína estar associada à localização prevista. Uma exceção é o classificador de 43 motivos cuja saída é um vetor binário indicando a

presença/ausência dos motivos na proteína. Os vetores de saída dos cinco classificadores são combinados para formar um vetor de entrada para o classificador SVM final. Este último classificador descreve um hiperplano que divide o espaço amostral em duas áreas. Os dados mais próximos do hiperplano e que definem a margem de separação são denominados vetores de suporte. A localização celular com a maior probabilidade é atribuída à proteína como previsão final. Como as proteínas podem pertencer a mais de uma localização celular, o SherLoc 2 fornece as várias localizações celulares possíveis juntamente com suas probabilidades em um sistema de ranqueamento, ao invés de uma única localização celular prevista (206).

4.5 Previsão e análise de vias metabólicas e de sinalização canônicas e processos celulares associados com as meningites

Buscando-se aprofundar o significado biológico dos resultados obtidos pela análise proteômica das amostras de líquido, as proteínas identificadas por espectrometria de massas foram analisadas utilizando-se o *software* MetaCore *Analytical suite* (GeneGo Inc.), que contém um banco de dados próprio curado manualmente, além de dados públicos e de bancos comerciais de acesso restrito (MetaCore™, GeneGo, St Joseph, MI, EUA). O banco de dados deste *software* contém informações de interações de proteína-proteína humana, proteína-DNA e proteína-RNA, além de pequenas moléculas, compostos químicos e drogas. Dentre as diversas opções de análises de dados disponíveis no MetaCore, a análise de enriquecimento (EA) é capaz de determinar vias metabólicas e de sinalização, funções biológicas e doenças associadas a uma dada lista de proteínas, além de permitir a visualização de mapas canônicos organizados hierarquicamente de acordo com a relevância de sua associação com os dados experimentais enviados ao *software*. Para esta análise, os Swiss Prot IDs das proteínas identificadas experimentalmente foram utilizados para obtenção de mapas de vias canônicas (GeneGo *maps*), processos celulares GeneGo, processos celulares *Gene Ontology* (GO) e classificação de doenças associadas à biomarcadores previamente

estabelecidos na literatura científica. Proteínas da lista de entrada podem ter interações físicas, e/ou funcionais (como ligação, fosforilação ou regulação transcricional) que são usadas pelo algoritmo para determinar o enriquecimento.

Os resultados apresentados foram classificados hierarquicamente de acordo com o valor de p calculado com base no teste de probabilidade de distribuição hipergeométrica (207). A significância do teste é avaliada de acordo com o tamanho da interseção entre o conjunto de dados de entrada, fornecido pelo usuário, e o conjunto de proteínas correspondentes a uma via metabólica ou de sinalização canônica, disponível no banco de dados do MetaCore™. Ou seja, a probabilidade de se obter, aleatoriamente, uma interseção de determinado tamanho entre os dados de entrada e do *software* segue uma distribuição hipergeométrica, em que a hipótese é nula, isto é, os dados são independentes. O valor de p é calculado como a probabilidade de que a interseção aleatória entre os dados do usuário e do *software* apresente um tamanho determinado ou maior do que este. Cada histograma da EA estima a significância de uma sobreposição dos dados de entrada com cada sub-rede gerada pelo *software*, baseada na interseção da lista de entrada com a união de todas as sub-redes geradas pelo MetaCore™, em cada experimento. Duas considerações: 1) geralmente, nem todas as proteínas do dado de entrada podem estar associadas com nós das redes de interações do MetaCore™ e, 2) algumas proteínas podem corresponder a múltiplos nós e, ainda, alguns nós podem corresponder a múltiplas proteínas. Neste último caso, os nós representam complexos de proteínas.

As vias metabólicas ou de sinalização canônicas são construídas previamente, pelo *software*, baseadas em propriedades comuns, tais como categoria Gene Ontology ou um conjunto de nós relacionado a uma determinada doença.

4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados de parâmetros citoquímicos do líquor obtidos dos prontuários de pacientes incluídos neste trabalho foram feitas com o pacote *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad software, CA, EUA). Assumindo-se que as variáveis não possuem uma distribuição normal, a análise foi feita usando-se o teste

de Kruskal-Wallis para comparação entre as medianas de todos os grupos. Quando esta diferença foi estatisticamente significativa, estes foram comparados, par-a-par, com o teste de Mann-Whitney U. As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de p foram menores que 0,05. O cálculo dos valores de sensibilidade e especificidade dos parâmetros citoquímicos para as meningites foi realizado a partir do teste de Fisher.

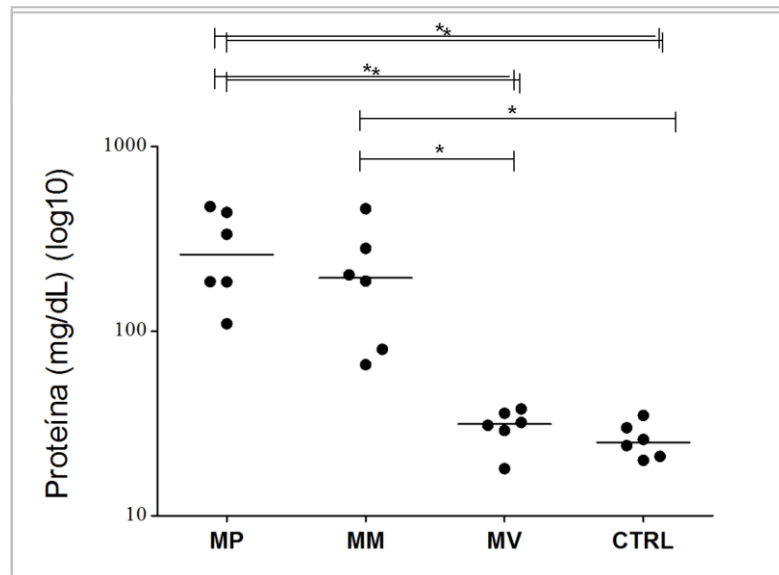
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do líquido de pacientes com meningite

Os resultados de exames dos parâmetros citoquímicos do líquido, a saber: contagem total e diferencial de leucócitos, proteínas totais e glicose dos pacientes com meningite bacteriana (pneumocócica ou meningocócica), meningite viral e indivíduos controles que participaram deste trabalho foram coletados a partir da revisão dos prontuários para comparação com dados pré-estabelecidos na literatura científica.

A avaliação do parâmetro contagem total de leucócitos demonstrou diferenças significativas entre os pacientes com meningites bacterianas em comparação àqueles com meningite viral ou controles e entre estes dois últimos (**Figura 1**). Os valores de mediana da contagem de leucócitos no líquido encontrados para pacientes com meningite pneumocócica (MP) e meningite meningocócica (MM) (MP: 1.199 células/mm³ e MM: 4.680 células/mm³) foram significativamente superiores aos encontrados para pacientes com meningite viral (MV) e controles (CTRL) (MV: 44,5 células/mm³ e CTRL: 2 células/mm³). Entretanto, foram observados sobreposições dos valores de leucócitos, por exemplo, entre os pacientes com meningite meningocócica e meningite viral (**Figura 1**), o que inviabiliza a discriminação entre estes pacientes.

Figura 1:
global de
no líquido de
com



Contagem
leucócitos
pacientes
meningite e

controles. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparação entre as medianas de todos os grupos (valor de $p = 0.0003$). A comparação par-a-par entre os grupos foi feita com o teste de Mann-Whitney U (GraphPad Prism 5.0). MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle. * = $p < 0,01$.

A concentração de proteínas no líquido é considerada um dos indicadores mais sensíveis de patologias no SNC (114). Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os pacientes com meningite bacteriana (MP: 260,5mg/dL e MM: 194,5mg/dL) em relação àqueles com meningite viral (MV: 31,5mg/dL) ou controles (CTRL: 25mg/dL) ($p < 0.01$) (**Figura 2**), mas não entre esses dois últimos, tendo em vista que ambos apresentaram valores de concentração de proteína dentro dos valores normais (18 a 58mg/dL). Apesar dos níveis de proteínas totais no líquido de indivíduos normais serem levemente distintos dos observados em pacientes com meningite viral, o valor de mediana destes últimos está incluído no intervalo considerado normal (208).

Figura 2: Proteínas totais no líquido de pacientes com meningite e controles. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparação entre as medianas de todos os grupos (valor de $p = 0.0005$). A comparação par-a-par entre os grupos foi feita com o teste de Mann-Whitney U (GraphPad Prism 5.0). MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle. * = $p < 0,01$.

As análises realizadas para os parâmetros contagem diferencial de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e glicose total no líquido não revelaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos investigados (**Figuras 3-4**).

Os valores de mediana encontrados para contagem diferencial de leucócitos em pacientes com meningite bacteriana (MP: 91% e MM: 94%) foram superiores àqueles encontrados em pacientes com meningite viral (MV: 43%) e controles (CTRL: 54%), mas as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0.05$).

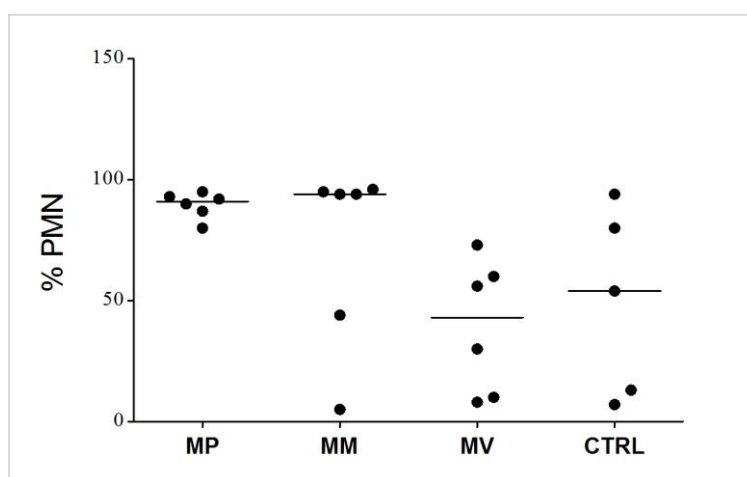


Figura 3: Contagem diferencial de leucócitos polimorfonucleares no líquido de pacientes com meningite e controles. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparação entre as medianas de todos os grupos (valor de $p = 0.066$). (GraphPad Prism 5.0). MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle; %PMN: porcentagem de leucócitos polimorfonucleares.

Os valores de mediana para glicose no líquido encontrados para pacientes com meningite pneumocócica (22,5mg/dL) foram inferiores aos encontrados para pacientes com meningite meningocócica (41mg/dL). Todos os pacientes com meningite viral e controles apresentaram concentração de glicose dentro dos valores normais (> 40mg/dL).

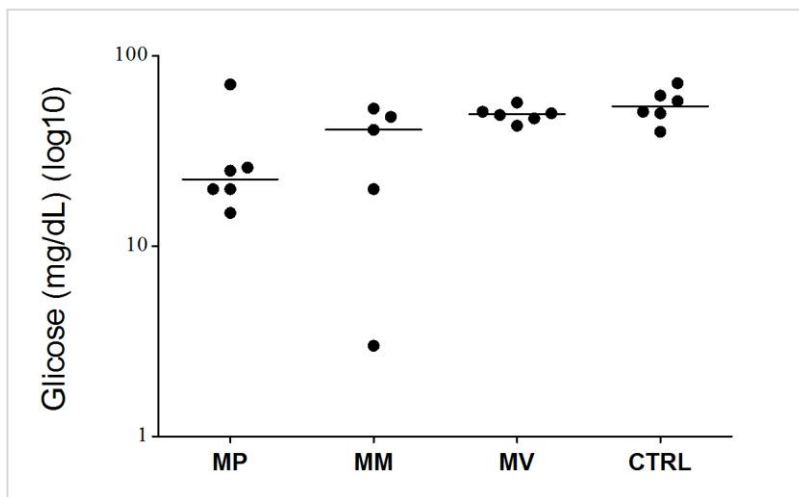


Figura 4: Glicose no líquido de pacientes com meningite e controles. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparação entre as medianas de todos os grupos (valor de $p = 0.050$). (GraphPad Prism 5.0). MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle.

Portanto, em nossa pequena casuística nenhum dos parâmetros citoquímicos clássicos, quando analisados isoladamente, mostrou-se suficientemente sensível e específico para o diagnóstico diferencial das meningites pneumocócica, meningocócica ou viral (**Tabela 3**). Esses resultados, interpretados conjuntamente com os sinais clínicos dos pacientes e os exames microbiológicos, permitiram-nos confirmar que os quatro grupos experimentais que foram investigados nas etapas seguintes deste trabalho eram compostos por amostras representativas de realidade clínica. Nem sempre os valores canônicos para glicorráquia, proteinorráquia, contagem global e diferencial de leucócitos foram observados nestes grupos.

Tabela 3: Valores de sensibilidade e especificidade dos parâmetros citoquímicos do líquido para as meningites

Parâmetro Citoquímico	MV ou MB	MP	MM	MV
		Sens/Espec	Sens/Espec	Sens/Espec
Leucócitos (células/mm³)	< 1000 ou > 1000	50% / 100%	66% / 100%	83% / 0
PMN	< 50 ou > 50	100% / 50%	83% / 50%	50% / 50%
Proteína (mg/dL)	< 100 ou > 100	100% / 100%	66% / 100%	0 / 0
Glicose (mg/dL)	> 40 ou < 40	83% / 100%	50% / 100%	0 / 0

O teste de Fisher foi realizado para calcular os valores de sensibilidade e especificidade para cada parâmetro citoquímico, por etiologia de meningite. Os valores de referência dos parâmetros citoquímicos foram compilados dos artigos científicos: (117, 152, 209-213). MB: meningite bacteriana; MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; sens: sensibilidade; espec: especificidade; PMN: células polimorfonucleares.

5.2 Processamento das amostras de líquido

O líquido contém pequenas moléculas, sais, peptídeos, proteínas e enzimas que desempenham papéis críticos em diversos processos fisiológicos. Para aperfeiçoar a resolução da eletroforese bidimensional é necessária a remoção da maior parte do conteúdo salino do líquido a fim de eliminar possíveis interferentes (214).

A precipitação de proteínas utilizando-se acetona gelada (-20°C) é amplamente empregada em processamento de amostras para análises proteômicas devido à simplicidade da técnica e alto rendimento (recuperação de até 94% das proteínas) (214-216). No presente trabalho, a precipitação de proteínas com acetona foi realizada antes e após a depleção de albumina e IgG presentes no líquido, com o objetivo de obter quantidade proteica suficiente para os subsequentes experimentos de análises comparativas de géis bidimensionais individuais e posterior identificação proteica por espectrometria de massas. Em condições normais, cerca de 100-350 µL de líquido são necessários para obtenção de aproximadamente 70 µg de proteína (214). Amostras de líquido em estado bruto de pacientes com meningite viral e controles apresentaram concentração proteica muito inferior às concentrações proteicas das amostras de líquido de pacientes com meningite bacteriana (**Tabela 4**). É importante ressaltar que, do conteúdo proteico total do líquido, mais de 50% corresponde à albumina e 15% ou mais, às imunoglobulinas (214). Por conseguinte, a depleção das proteínas abundantes é essencial para a detecção de proteínas menos representativas no líquido. Para obtenção de quantidade de proteína suficiente para as etapas posteriores do presente trabalho, o dobro do volume de líquido foi utilizado para amostras de pacientes com meningite viral e controles em comparação com pacientes com meningites bacterianas (**Tabela 4**).

O kit comercial utilizado neste trabalho para depleção de albumina e imunoglobulina G (IgG) foi desenvolvido originalmente para amostras de soro, que possuem concentrações de proteína muito superiores às do líquido. Por isso, optou-se pela concentração de proteínas das amostras de líquido por precipitação com acetona previamente à depleção de albumina e IgG. Desta maneira, foi possível utilizar um volume maior de líquido em uma mesma coluna, sem que houvesse saturação da mesma, adequando o volume da amostra a ser aplicado às colunas do

kit para um volume final de 100µL. A coluna do kit de depleção foi projetada para até 50µL de plasma não diluído que possui, aproximadamente, 40mg/mL de albumina e 15mg/mL de IgG.

Os eluatos da coluna de depleção foram novamente precipitados com acetona e a quantidade média de proteína obtida por amostra de líquido de pacientes com meningite bacteriana a partir de 300µL foi de 31 e 60µg para as formas meningocócicas e pneumocócicas, respectivamente. Obviamente, as amostras de líquido de indivíduos controles e pacientes com meningite viral apresentaram rendimento proteico muito inferior: média de 4,2 e 7,6µg, respectivamente a partir de 600µL de líquido (**Tabela 4**). Os resultados de concentração proteica das amostras brutas de líquido dos pacientes demonstrados na **Tabela 4** diferem dos encontrados na **Figura 2** porque pode ter havido perda proteica durante o processamento das amostras de líquido ou nas precipitações das amostras feitas previamente ao método de quantificação por Bradford, cujo resultado é apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Concentração proteica de amostras de líquido bacterianas, virais e controles

Processamento	MP	MM	MV	CTRL
[] proteica inicial (µg/µL) mediana	8,16	6,46	0,18	0,24
Volume bruto (µL)	300 a 350	300 a 350	550 a 600	550 a 600
1ª concentração com acetona (média do nº de vezes)	35X	31X	45X	38X
Volume de eluato após depleção (µL)	300	300	300	300
2ª concentração com acetona	20X	20X	20X	20X
[] proteica final (µg/µL) mediana	2,12	2,40	0,51	0,32

MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle; []: concentração; nº: número.

5.2.1 Eletroforese Unidimensional – SDS-PAGE

Amostras de líquido dos seis pacientes com cada etiologia de meningite estudada e do grupo controle contendo 0,5µg de proteína foram analisadas por SDS-PAGE unidimensional em seu estado bruto e após a depleção de albumina e IgG e concentração com acetona, de acordo com Laemmli (201). A eletroforese de proteínas do líquido em estado bruto permitiu verificar que as proteínas presentes nas amostras de líquido estudadas não estavam degradadas. A presença de bandas bem definidas de alto e baixo peso molecular e a ausência de arraste permitiram esta constatação. Além disso, a visualização dos perfis proteicos de cada amostra de líquido nas duas condições – em estado bruto e após depleção – confirmou a eficácia do processo de depleção à medida que a redução da banda de massa molecular correspondente à albumina (66,2kDa) pode ser facilmente verificada em todas as amostras de meningite e controles, como exemplificado por meningite pneumocócica (**Figura 5**). A quantidade de albumina em amostras biológicas é superior a de IgG, por isso a visualização da depleção de albumina é mais evidente. Por outro lado, esse processo de depleção é incapaz de eliminar todo o conteúdo de albumina da amostra podendo haver resquícios dessa proteína nas amostras de líquido após a depleção. As bandas correspondentes às cadeias leve e pesada de IgG (cadeia leve: 22kDa; cadeia pesada: 50kDa) (3) não foram observadas em todas as amostras em estado bruto.

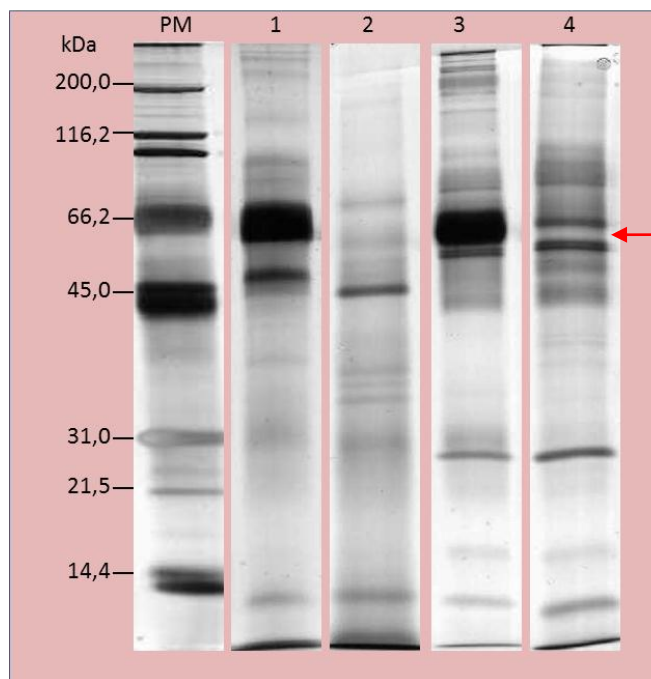


Figura 5: Perfil eletroforético de amostras de líquido de pacientes com meningite. 1-4: amostras de líquido de pacientes com meningite pneumocócica em estado bruto (1 e 3) e após depleção de albumina e IgG (2 e 4). Foi aplicado 0,5µg de proteína por amostra e os géis unidimensionais foram corados por nitrato de prata. PM: padrão de massa molecular Broad-Range (Bio-Rad). A seta vermelha indica a banda de albumina depletada (66,2kDa).

5.2.2 Eletroforese bidimensional e análise proteômica do líquido de pacientes com meningite

Foram confeccionados doze géis bidimensionais contendo 0,5 µg de proteínas do líquido (representando amostras de seis indivíduos e suas duplicatas técnicas) para cada etiologia de meningite estudada e grupo controle, totalizando 48 géis (**Figuras 6-9**). A quantidade de proteína utilizada para a confecção dos géis bidimensionais foi suficiente para a detecção de um número de *spots* informativos para a análise. As imagens digitalizadas dos géis bidimensionais foram utilizadas para a análise qualitativa do proteoma do líquido, isto é, a comparação dos perfis proteicos de líquido de pacientes com meningite pneumocócica, meningite meningocócica e meningite viral entre si, além da comparação entre estes últimos e os perfis proteicos obtidos de líquido de indivíduos controles.

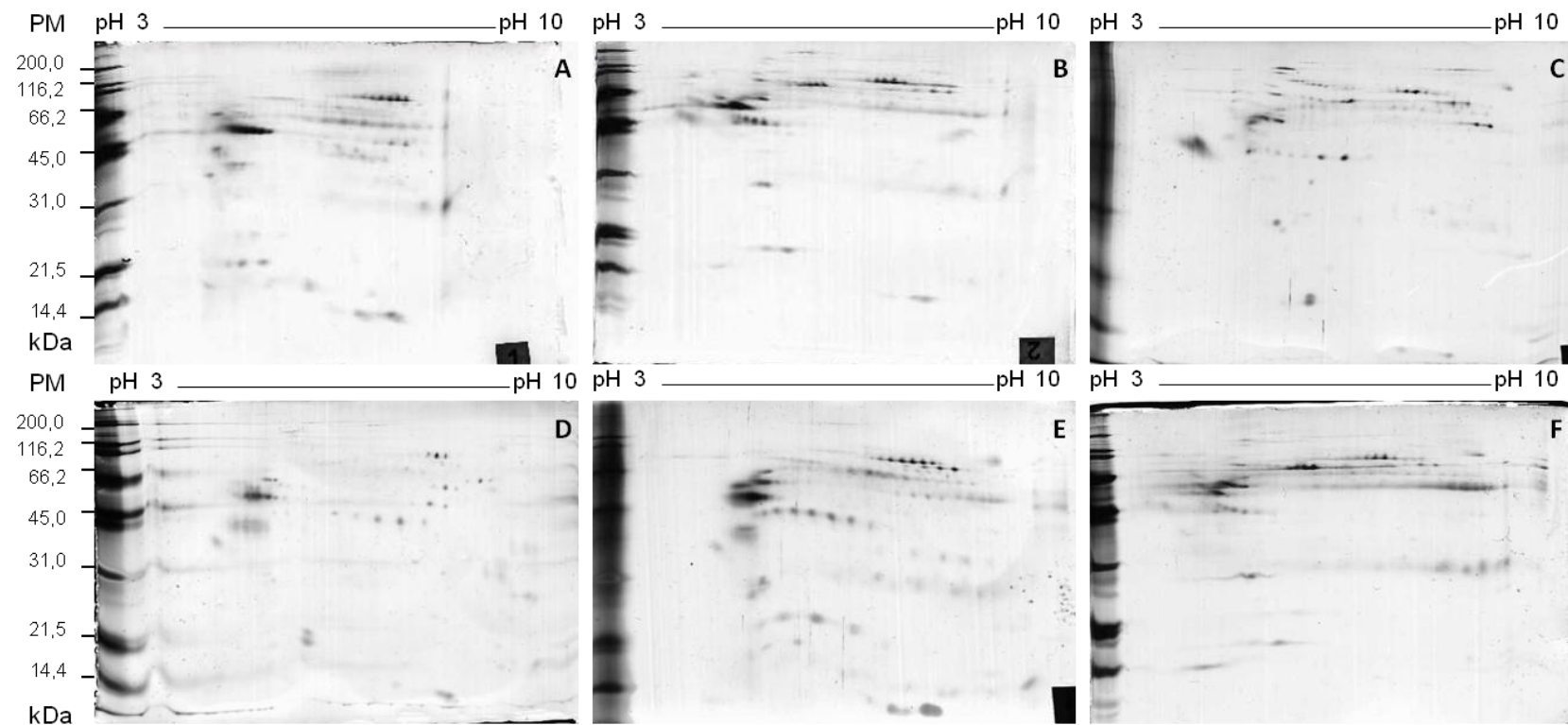


Figura 6: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica. Os painéis A-F correspondem aos géis bidimensionais representativos das duplicatas técnicas dos pacientes 1 a 6, respectivamente. A numeração dos pacientes corresponde àquela feita na **Tabela 1**. Padrão de peso molecular (*Broad Range* -Bio-Rad).

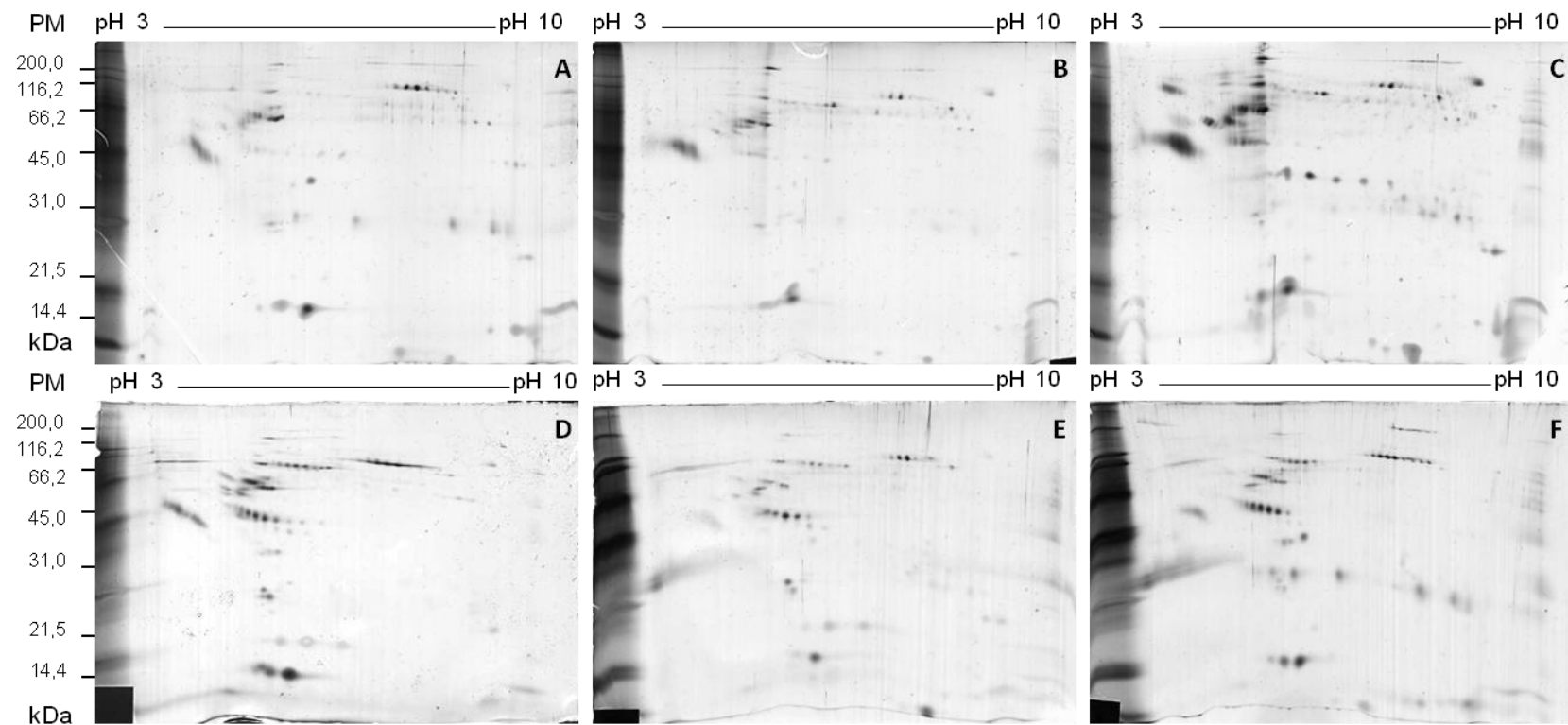


Figura 7: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica. Os painéis A-F correspondem aos géis bidimensionais representativos das duplicatas técnicas dos pacientes 1 a 6, respectivamente. A numeração dos pacientes corresponde àquela feita na **Tabela 1**. Padrão de peso molecular (*Broad Range* -Bio-Rad).

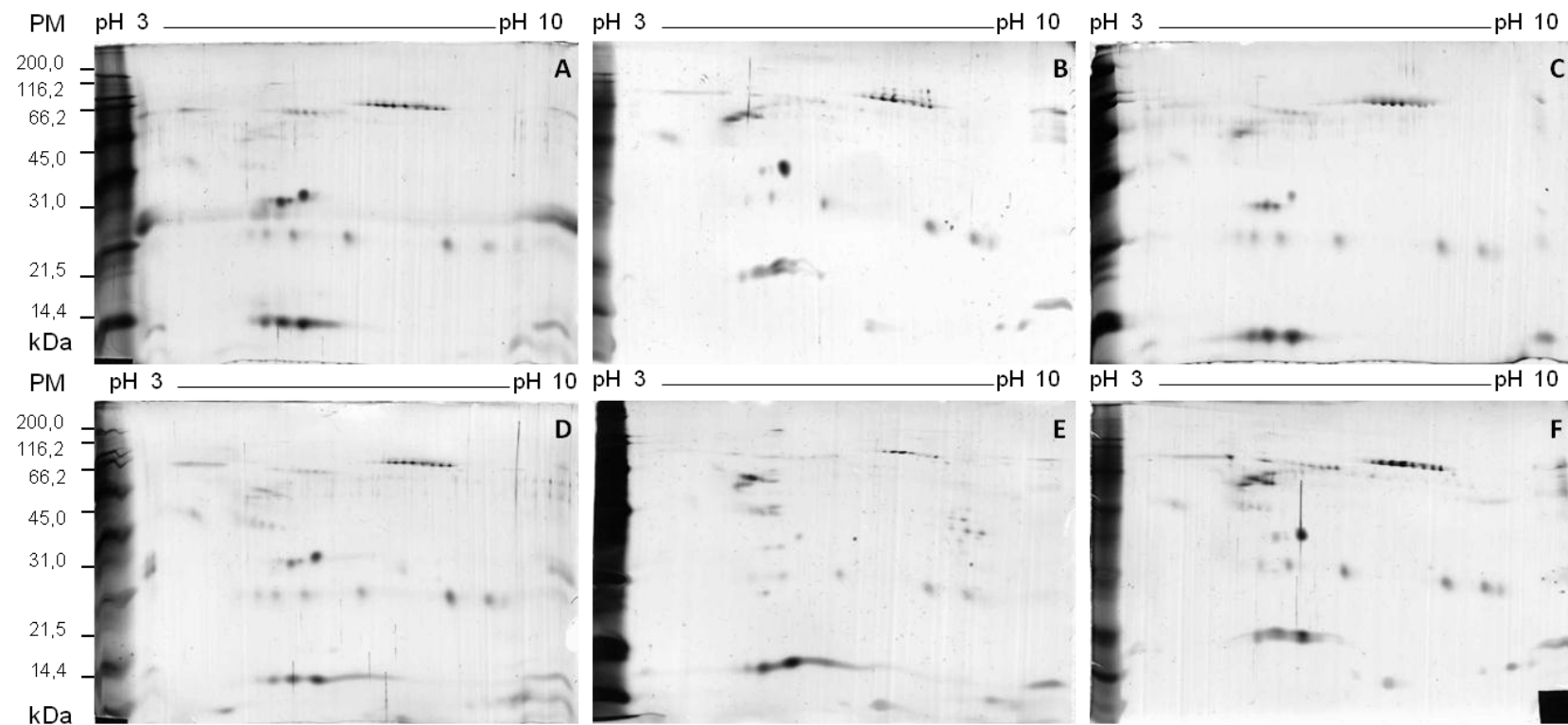


Figura 8: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de pacientes com meningite viral. Os painéis A-F correspondem aos géis bidimensionais representativos das duplicatas técnicas dos pacientes 1 a 6, respectivamente. A numeração dos pacientes corresponde àquela feita na **Tabela 1**. Padrão de peso molecular (*Broad Range* -Bio-Rad).

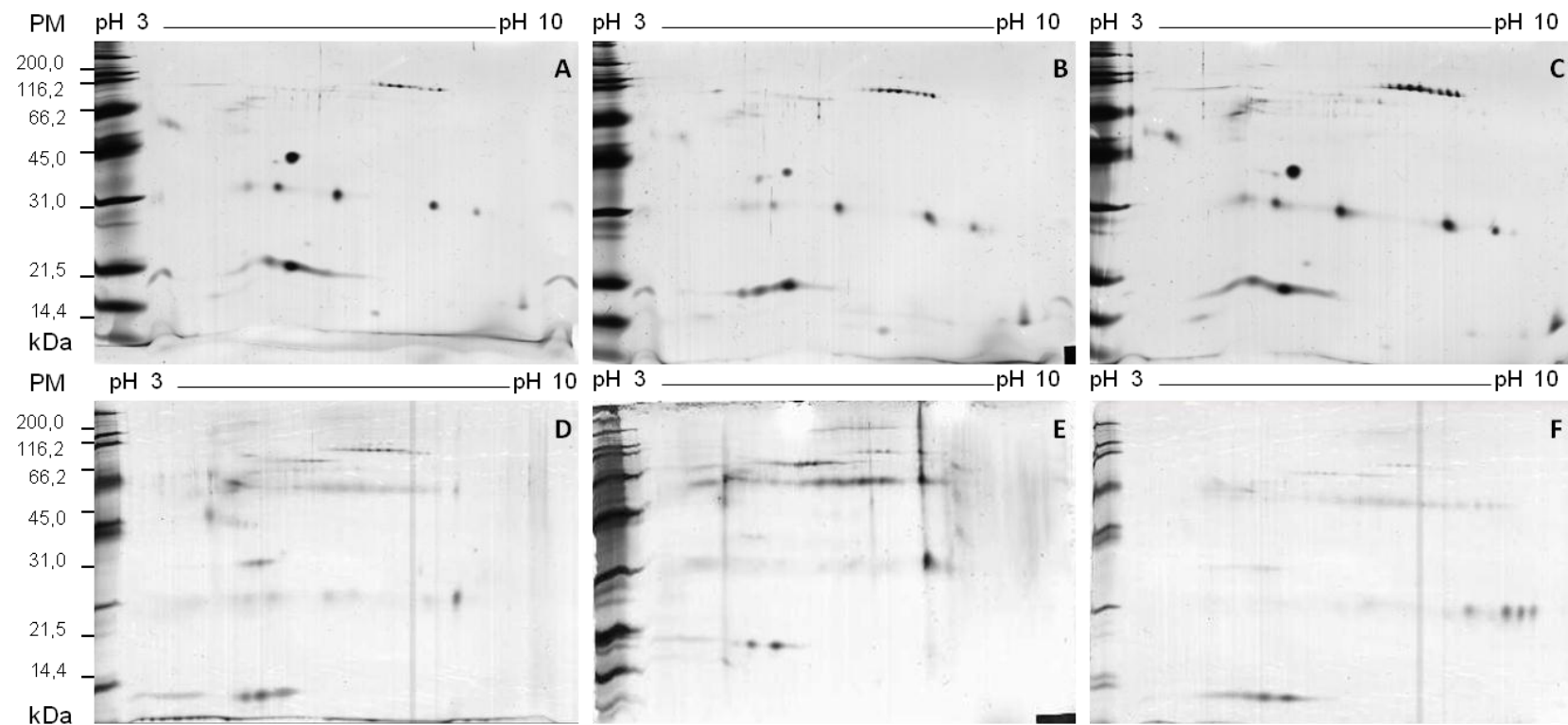


Figura 9: Géis bidimensionais de proteínas do líquido de indivíduos controles. Os painéis A-F correspondem aos géis bidimensionais representativos das duplicatas técnicas dos pacientes 1 a 6, respectivamente. A numeração dos pacientes corresponde àquela feita na **Tabela 1**. Padrão de peso molecular (*Broad Range* -Bio-Rad).

A análise qualitativa dos géis bidimensionais foi feita utilizando-se o programa PDQuest 8.0 (Bio-Rad, CA, EUA), baseada na presença ou na ausência dos *spots* encontrados nos géis dos pacientes para cada etiologia de meningite estudada, ou dos indivíduos controles. Inicialmente, a detecção dos *spots* foi realizada automaticamente pelo *software*, seguida da adição de *spots* inicialmente não detectados ou remoção manual de artefatos detectados pelo *software*.

Para cada etiologia de meningite e para o grupo de indivíduos controles foram formados os respectivos subconjuntos interseção compostos por *spots* presentes em todos os 12 géis bidimensionais contendo as amostras de seis indivíduos de um dado grupo e conjuntos união compostos pelos *spots* observados em pelo menos um dos 12 géis bidimensionais com as amostras dos seis indivíduos de um dado grupo, conforme mostrado nas **Figuras 10 a 13 e Tabela 5**.

Tabela 5: Número de *spots* que compõem os subconjuntos interseção e conjuntos união do líquido de pacientes com meningite e controles

	MP	MM	MV	CTRL
União (U)	170	105	75	121
Interseção ($\cap$)	23	33	27	17

MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle.

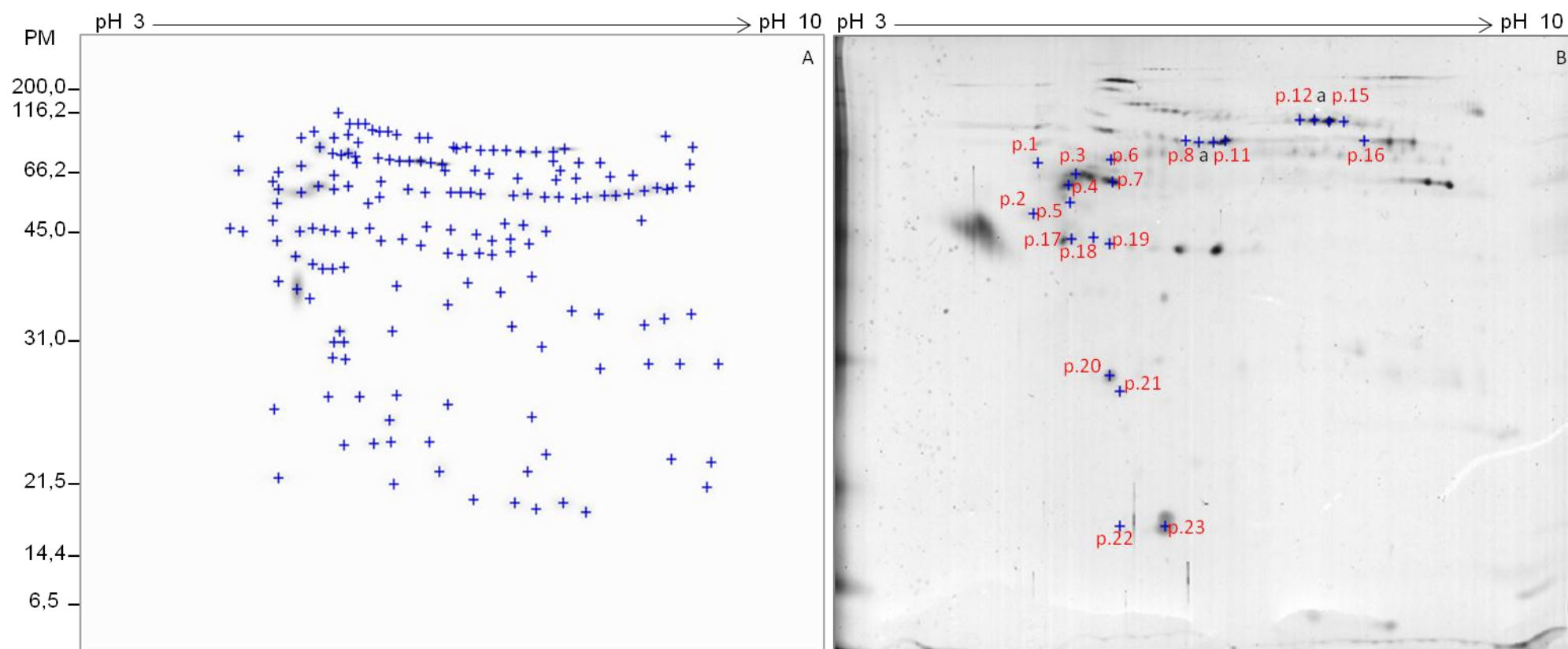


Figura 10: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção de pacientes com meningite pneumocócica. O painel A mostra os *spots* do conjunto união do grupo de pacientes com meningite pneumocócica destacado em uma imagem do gel *master* obtido a partir da análise com o *software* PDQuest dos doze géis bidimensionais deste grupo. O painel B mostra o subconjunto interseção de *spots* dos pacientes com meningite pneumocócica detectado na imagem de um dos géis bidimensionais da análise corado com nitrato de prata. A numeração dos *spots* (p.1 a p.23) é a mesma usada na identificação por MS/MS, como listado nas tabelas do Apêndice I.

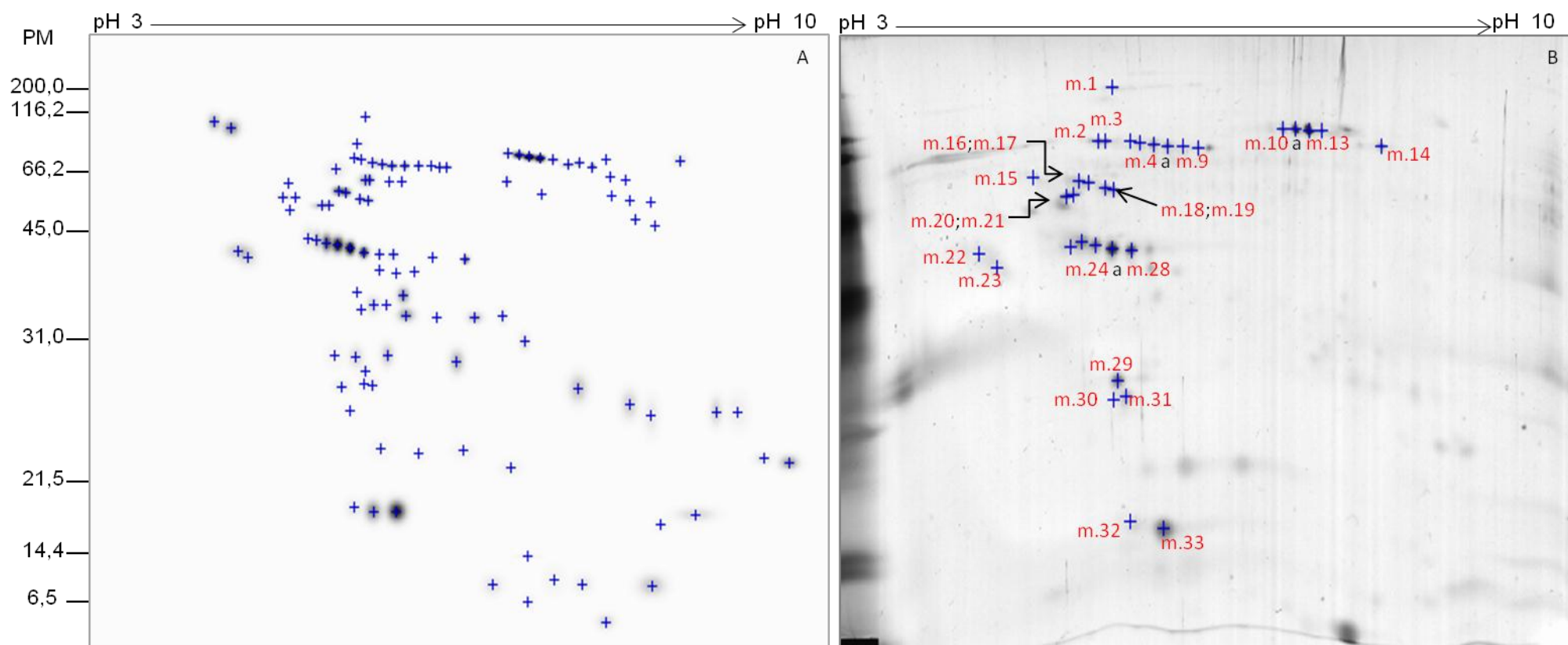


Figura 11: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção de pacientes com meningite meningocócica. O painel A mostra os *spots* do conjunto união do grupo de pacientes com meningite meningocócica destacado em uma imagem do gel *master* obtido a partir da análise com o *software* PDQuest dos doze géis bidimensionais deste grupo. O painel B mostra o subconjunto interseção de *spots* dos pacientes com meningite meningocócica detectado na imagem de um dos géis bidimensionais da análise corado com nitrato de prata. A numeração dos spots (**m.1** a **m.33**) é a mesma usada na identificação por MS/MS, como listado nas tabelas do Apêndice I.

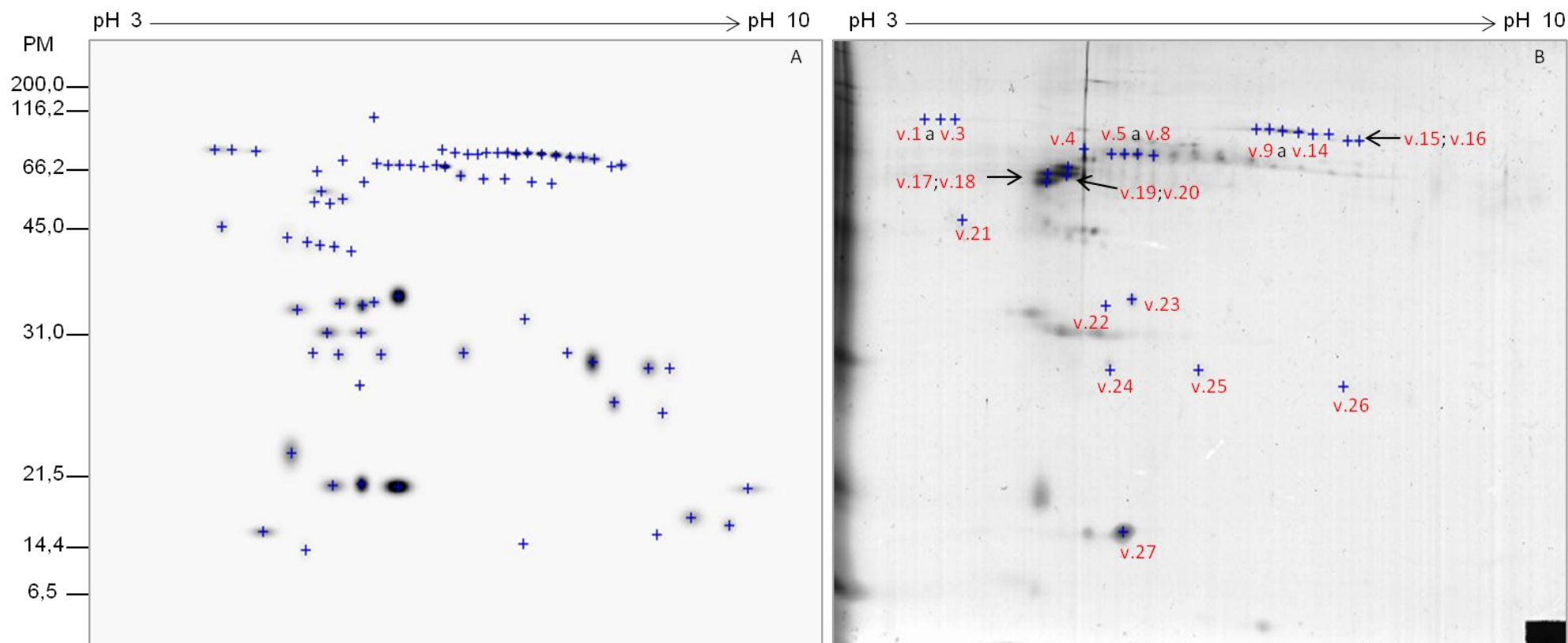


Figura 12: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção de pacientes com meningite viral. O painel A mostra os *spots* do conjunto união do grupo de pacientes com meningite viral destacado em uma imagem do gel *master* obtido a partir da análise com o *software* PDQuest dos doze géis bidimensionais deste grupo. O painel B mostra o subconjunto interseção de *spots* dos pacientes com meningite viral detectado na imagem de um dos géis bidimensionais da análise corado com nitrato de prata. A numeração dos *spots* (v.1 a v.27) é a mesma usada na identificação por MS/MS, como listado nas tabelas do Apêndice I.

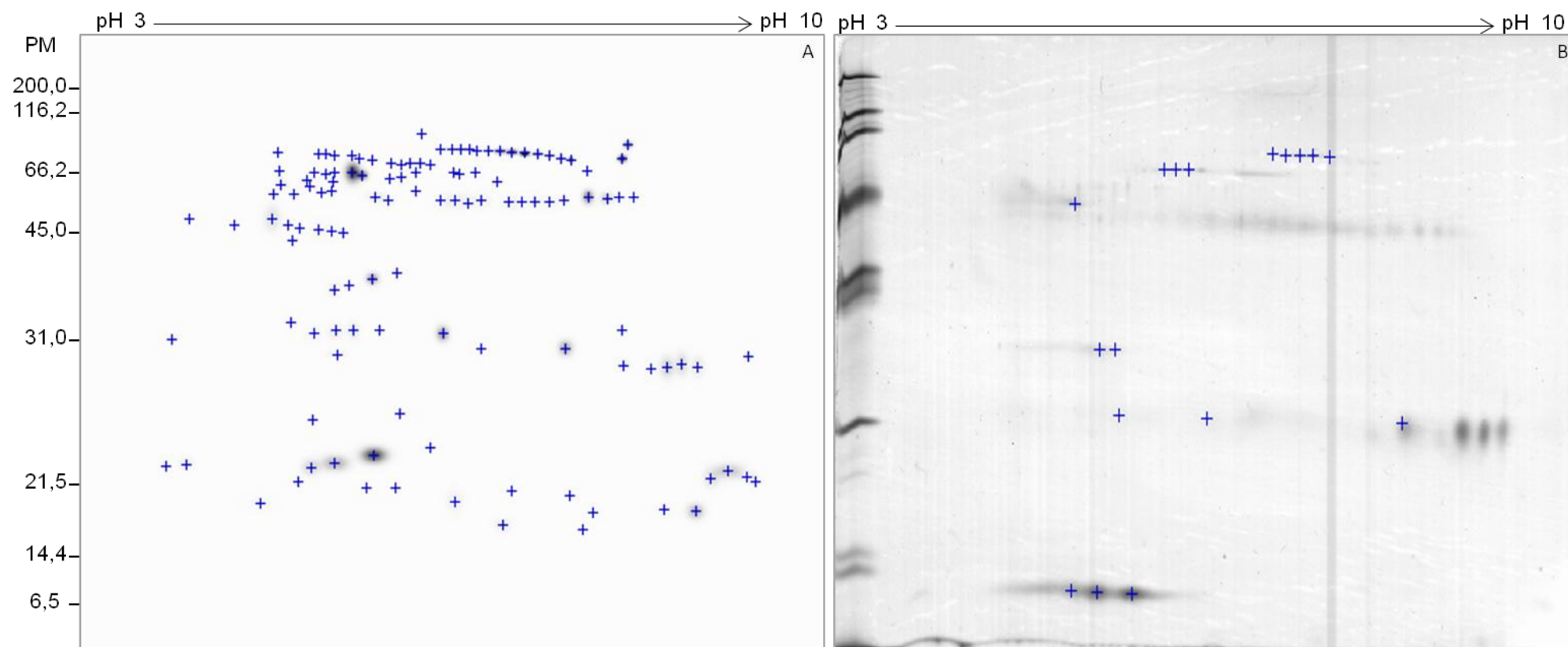


Figura 13: Imagem do conjunto união e do subconjunto interseção do grupo de indivíduos controles. O painel A mostra os *spots* do conjunto união do grupo de indivíduos controles destacado em uma imagem do gel *master* obtido a partir da análise com o *software* PDQuest dos doze géis bidimensionais deste grupo. O painel B mostra o subconjunto interseção de *spots* dos indivíduos controles detectado na imagem de um dos géis bidimensionais da análise corado com nitrato de prata.

A comparação dos subconjuntos interseção do grupo de pacientes com cada etiologia de meningite estudada com os conjuntos união do grupo de pacientes com as outras etiologias de meningite ou de indivíduos controles resultou em *spots* distintivos que foram encontrados apenas no subconjunto interseção de cada etiologia de meningite (**Tabela 6 e Figuras 14-16**).

Tabela 6: *Spots* definidos na análise comparativa entre as diferentes etiologias de meningite e grupo controle

	CONJUNTOS UNIÃO							
	CTRL		MP		MM		MV	
	(121 <i>spots</i>)		(170 <i>spots</i>)		(105 <i>spots</i>)		(75 <i>spots</i>)	
SUBCONJUNTOS INTERSEÇÃO	Comum	Distintivo	Comum	Distintivo	Comum	Distintivo	Comum	Distintivo
MP (23 <i>spots</i>)	20	3	-	-	19	4	15	8
MM (33 <i>spots</i>)	12	21	24	9	-	-	19	14
MV (27 <i>spots</i>)	20	7	16	11	16	11	-	-

MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle.

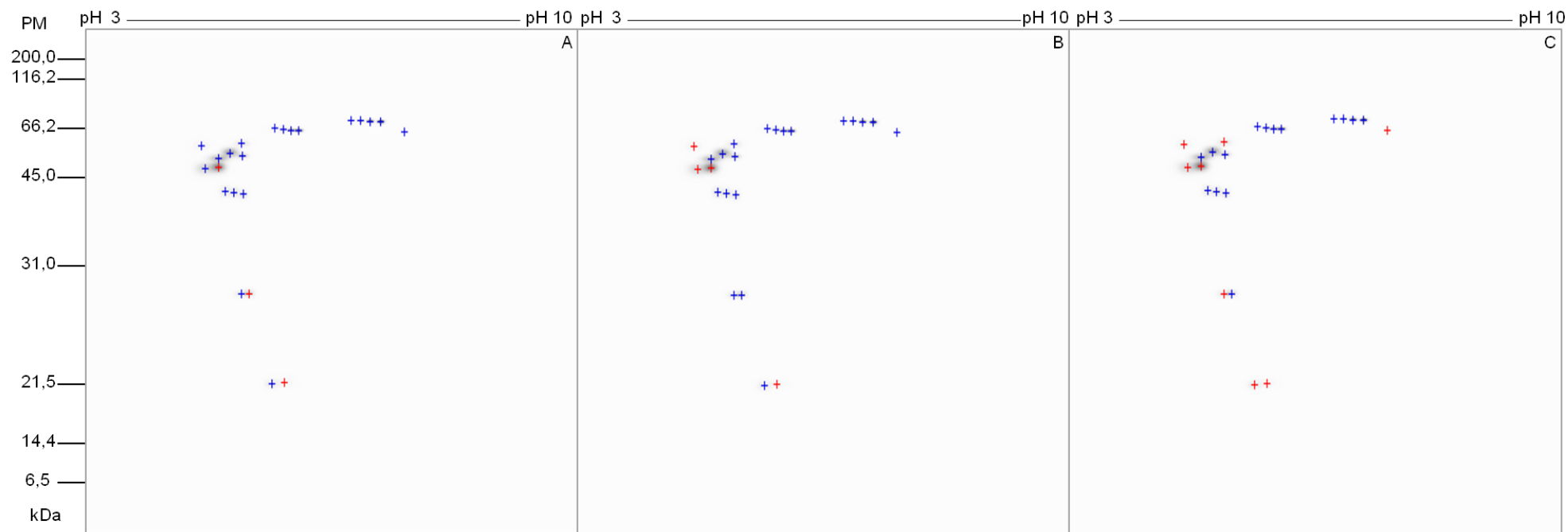


Figura 14: Gel *master* do subconjunto interseção de pacientes com meningite pneumocócica em comparação aos conjuntos união de indivíduos controles e demais etiologias de meningite. Os *spots* marcados de vermelho ocorrem no subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite pneumocócica, mas não nos conjuntos união do grupo controle (painel A: 3 *spots*) ou das demais etiologias de meningite – meningocócica (painel B: 4 *spots*) e viral (painel C: 8 *spots*). Os *spots* marcados de azul são comuns ao subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite pneumocócica e aos conjuntos união do grupo controle ou demais etiologias de meningite.

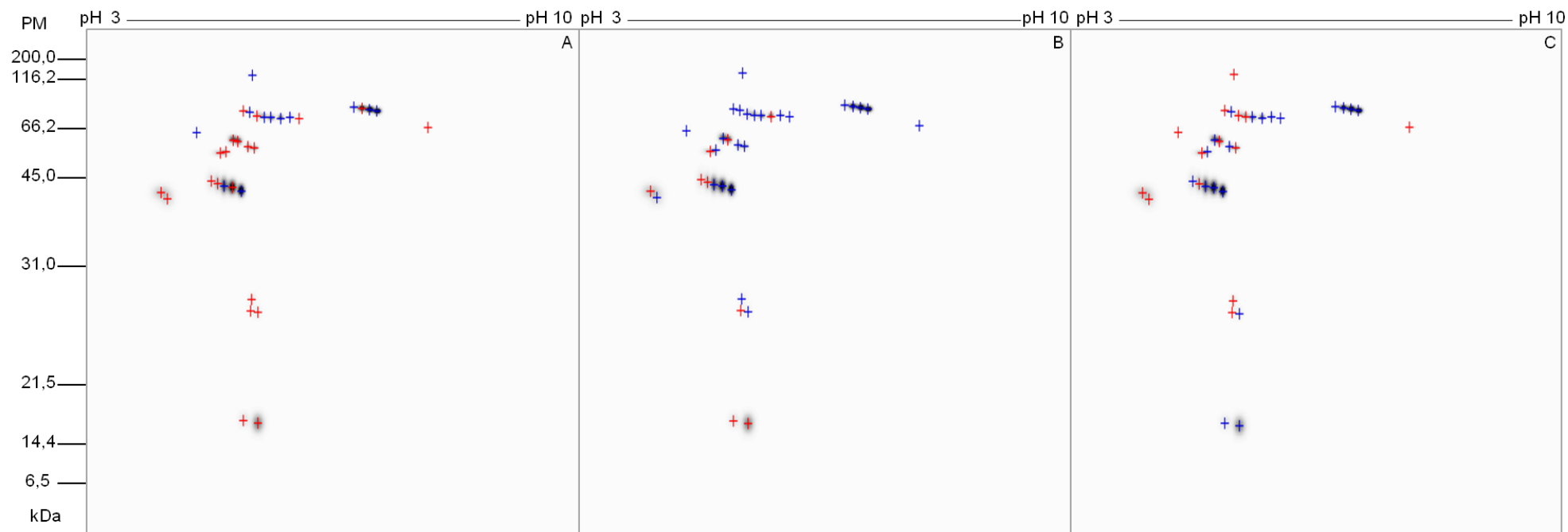


Figura 15: Gel *master* do subconjunto interseção de pacientes com meningite meningocócica em comparação aos conjuntos união de indivíduos controles e demais etiologias de meningite. Os *spots* marcados de vermelho ocorrem no subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica, mas não nos conjuntos união do grupo controle (painel A: 21 *spots*) ou das demais etiologias de meningite – pneumocócica (painel B: 9 *spots*) e viral (painel C: 14 *spots*). Os *spots* marcados de azul são comuns ao subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica e aos conjuntos união do grupo controle ou demais etiologias de meningite.

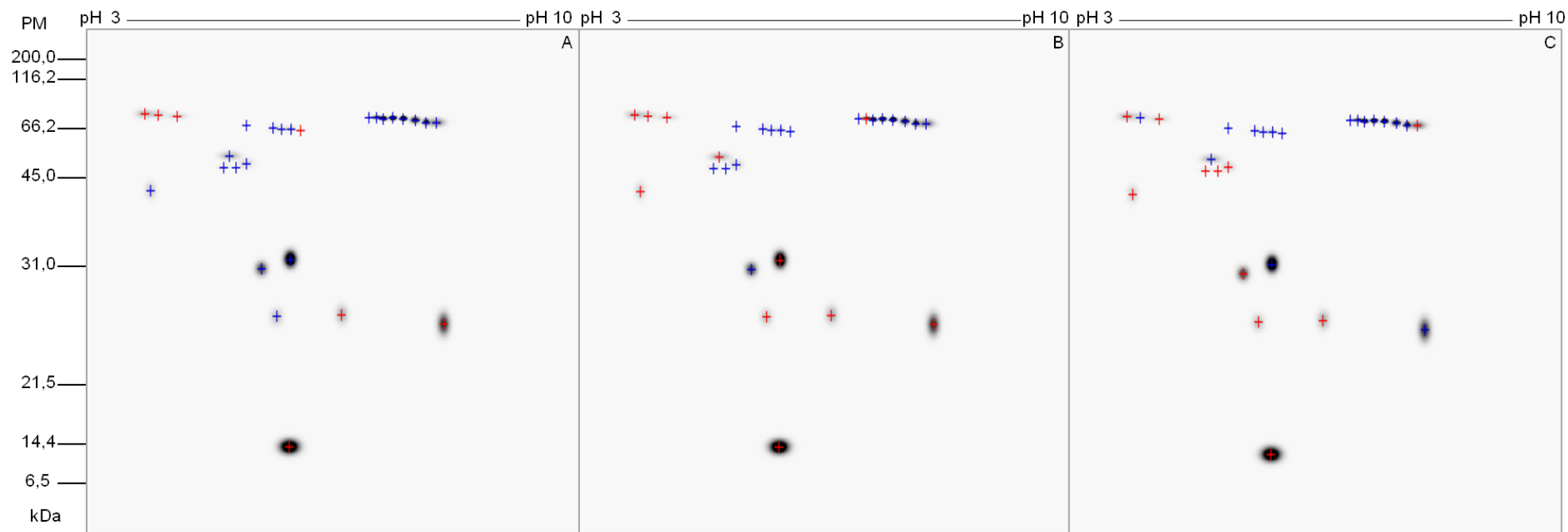


Figura 16: Gel *master* do subconjunto interseção de pacientes com meningite viral em comparação aos conjuntos união de indivíduos controles e demais etiologias de meningite. Os *spots* marcados de vermelho ocorrem no subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite viral, mas não nos conjuntos união do grupo controle (painel A: 7 *spots*) ou das demais etiologias de meningite – pneumocócica (painel B: 11 *spots*) e meningocócica (painel C: 11 *spots*). Os *spots* marcados de azul são comuns ao subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite viral e aos conjuntos união do grupo controle ou demais etiologias de meningite.

Os resultados das análises comparativas entre os *spots* do subconjunto interseção de pacientes com meningite pneumocócica e os *spots* do conjunto união do grupo controle e das outras etiologias de meningite resultaram em *spots* únicos do subconjunto interseção dos pacientes com meningite pneumocócica, conforme apresentado na **Figura 17**.

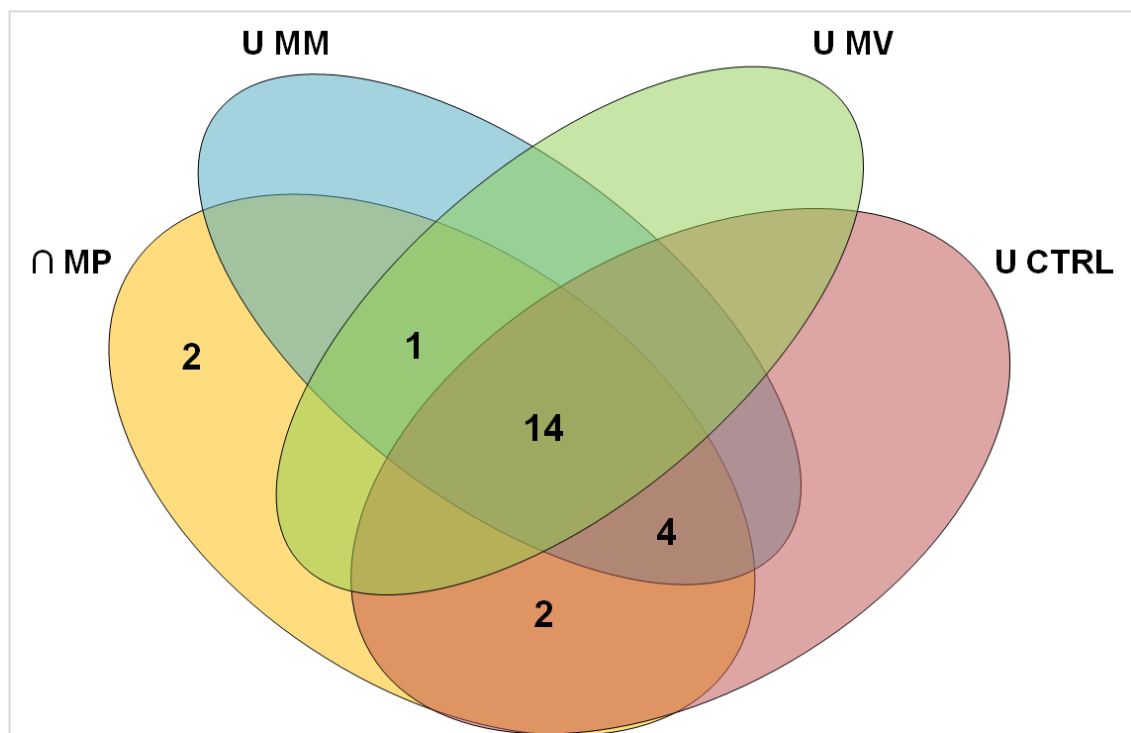


Figura 17: Diagrama de Venn para a distribuição de *spots* do subconjunto interseção de meningite pneumocócica. Foram encontrados somente dois *spots* únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite pneumocócica após as análises comparativas entre o subconjunto interseção de meningite pneumocócica e os conjuntos união com as outras etiologias de meningite e do grupo controle ($n = 23$ *spots*).

Os resultados das análises comparativas entre os *spots* do subconjunto interseção de pacientes com meningite meningocócica e os *spots* do conjunto união do grupo controle e das outras etiologias de meningite resultaram em *spots* únicos do subconjunto interseção dos pacientes com meningite meningocócica, conforme apresentado na **Figura 18**.

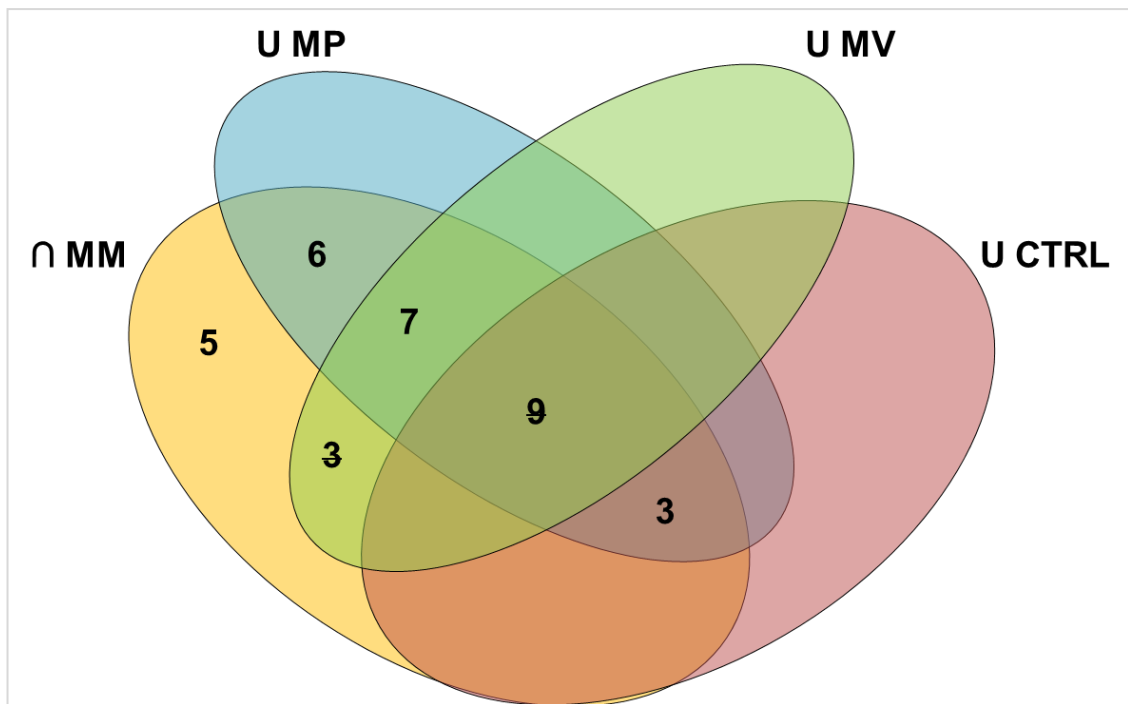


Figura 18: Diagrama de Venn para a distribuição de *spots* do subconjunto interseção de meningite meningocócica. Foram encontrados cinco *spots* únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica após as análises comparativas entre o subconjunto interseção de meningite meningocócica e os conjuntos união com as outras etiologias de meningite e do grupo controle ($n = 33$ *spots*).

Os resultados das análises comparativas entre os *spots* do subconjunto interseção de pacientes com meningite viral e os *spots* do conjunto união do grupo controle e das outras etiologias de meningite resultaram em *spots* únicos do subconjunto interseção dos pacientes com meningite viral, conforme apresentado na **Figura 19**.

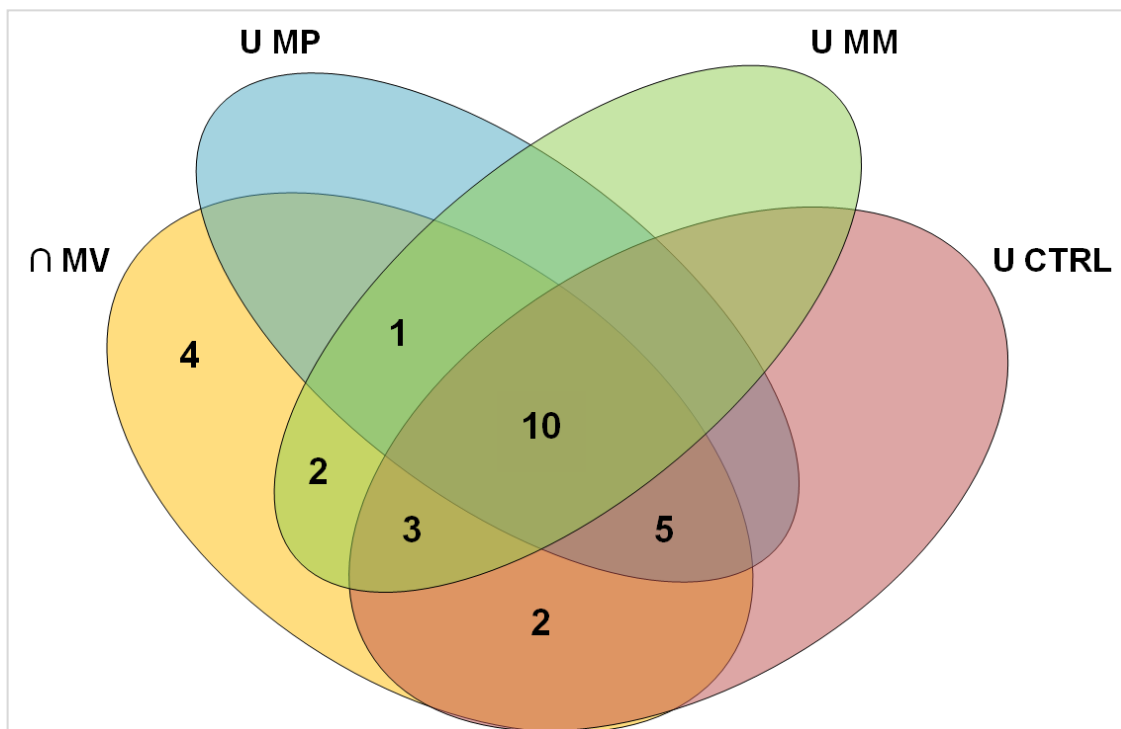


Figura 19: Diagrama de Venn para a distribuição de *spots* do subconjunto interseção de meningite viral. Foram encontrados quatro *spots* únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite viral após as análises comparativas entre o subconjunto interseção de meningite viral e os conjuntos união dos grupos com as outras etiologias de meningite e do grupo controle ($n = 27$ *spots*).

Sendo assim, os *spots* únicos encontrados nos subconjuntos interseção de cada etiologia de meningite foram selecionados para identificação por espectrometria de massas para posterior composição do modelo preditivo qualitativo das meningites (**Figura 20**).

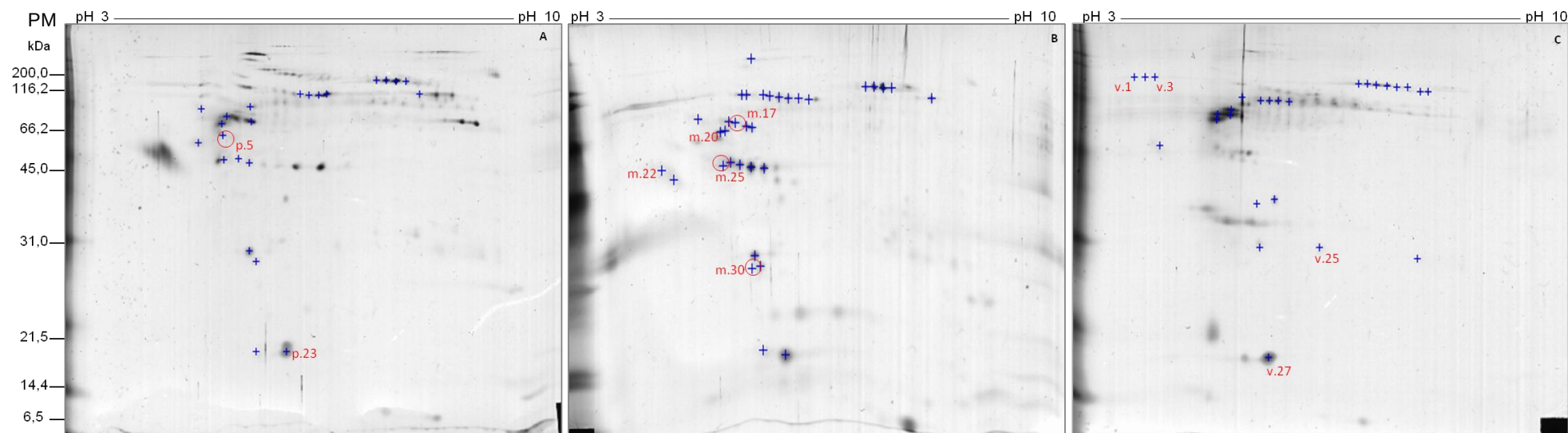


Figura 20: Imagem de *spots* únicos para as meningites. As imagens mostradas correspondem a um dos géis bidimensionais utilizados nas análises comparativas, corados com nitrato de prata, sendo que a imagem do painel A mostra os *spots* únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite pneumocócica (**p.5** e **p.23**), no painel B, os *spots* únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica (**m.17**, **m.20**, **m.22**, **m.25** e **m.30**) e, no painel C, os *spots* únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite viral (**v.1**, **v.3**, **v.25** e **v.27**). Alguns *spots* únicos foram marcados com círculos vermelhos para melhor visualização (MP: **p.5**; MM: **m.17**, **m.25** e **m.30**).

5.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

5.3.1 Géis bidimensionais de proteínas de *pool* do líquido de pacientes com meningite

A análise comparativa das imagens dos géis bidimensionais com proteínas do líquido de pacientes com meningite e controles possibilitou a seleção de *spots* proteicos que correspondem a potenciais biomarcadores para cada etiologia de meningite.

Para obter *spots* com quantidade de proteína suficiente para a espectrometria de massas, géis bidimensionais foram confeccionados com *pool* de amostras de líquido de três pacientes com meningite pneumocócica, ou meningite meningocócica ou meningite viral, selecionadas aleatoriamente entre aquelas utilizadas na etapa anterior de análise comparativa dos proteomas. Para cada etiologia de meningite, três géis bidimensionais foram confeccionados contendo 10, 40 e 100µg de proteína a fim de aumentar a probabilidade de sucesso na identificação das proteínas por espectrometria de massas (**Figuras 21-23**). Os géis bidimensionais confeccionados com menor quantidade de proteína (10µg) apresentam um perfil de separação de *spots* mais semelhante aos géis utilizados na análise comparativa. Entretanto, a quantidade de proteína presente em cada *spot* pode não ser suficiente para sua identificação por espectrometria de massas. Por isso, foram utilizados os outros géis com quantidade maior de proteína.

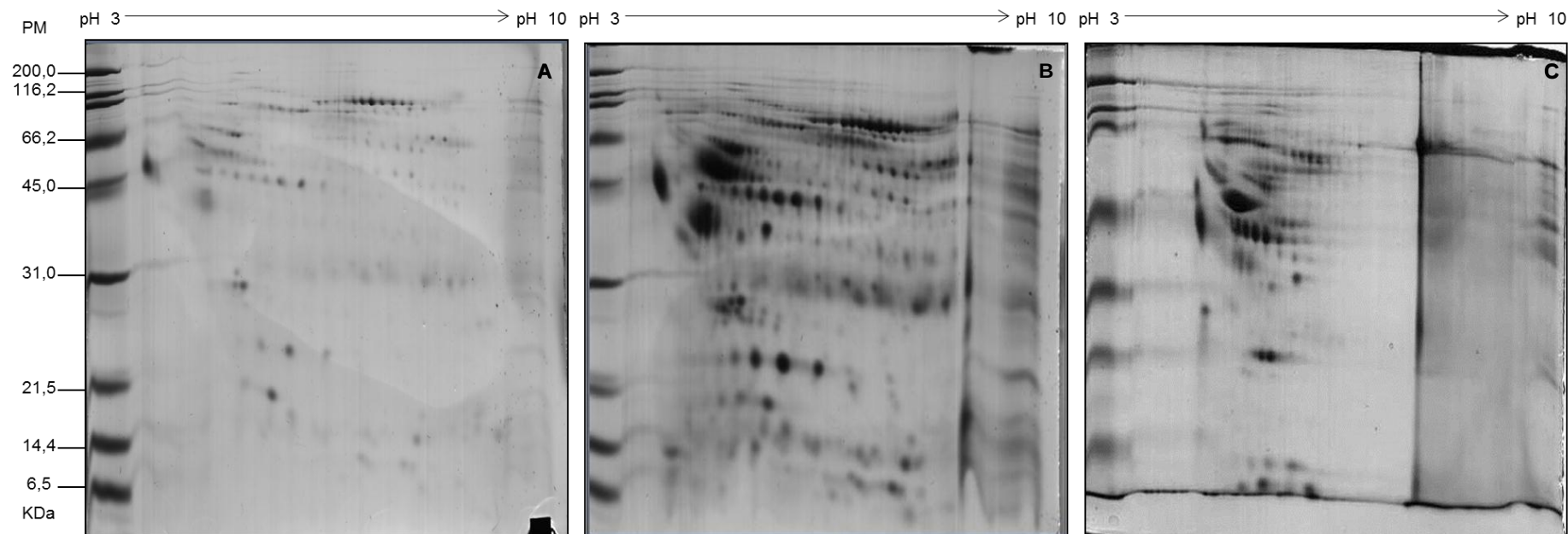


Figura 21: Géis bidimensionais de *pool* de proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica. Os painéis A, B e C correspondem aos géis bidimensionais de *pool* contendo 10, 40 e 100µg de proteínas de líquido de pacientes com meningite pneumocócica, respectivamente. Para a focalização isoeletrica, proteínas do líquido de pacientes com meningite foram aplicados em fitas de IPG de sete centímetros com gradiente de separação não linear de pH 3-10. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% e coradas com Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Broad-Range* (Bio-Rad).

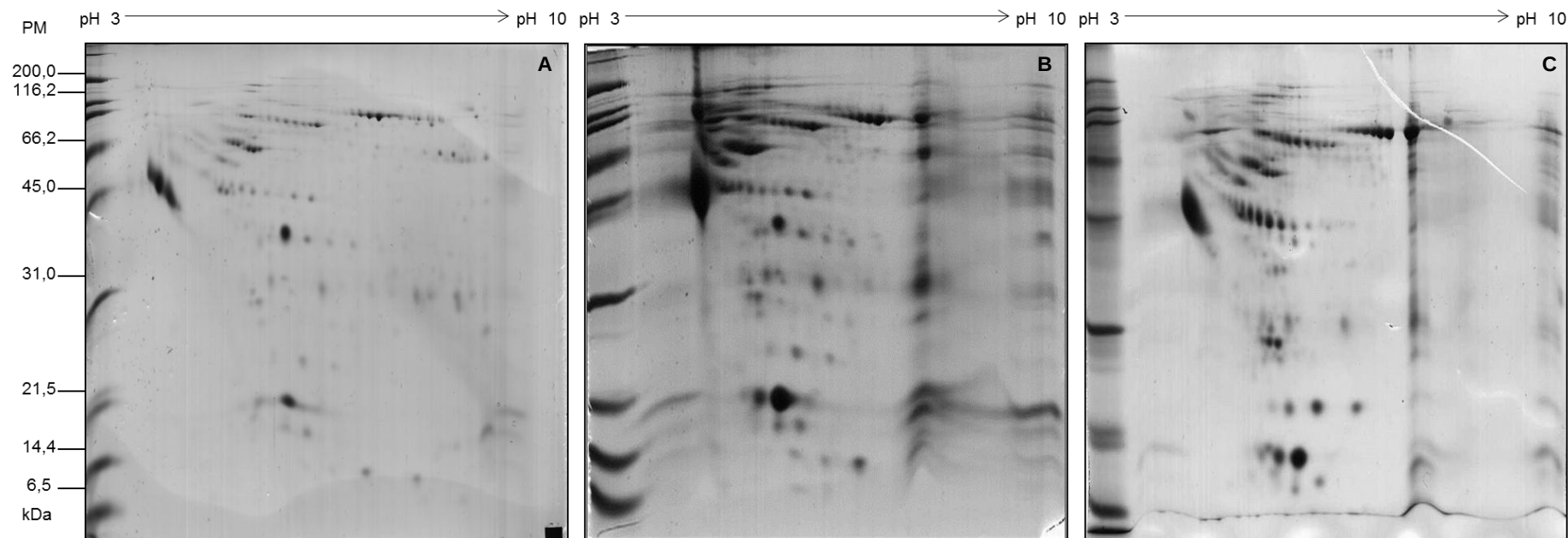


Figura 22: Géis bidimensionais de *pool* de proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica. Os painéis A, B e C correspondem aos géis bidimensionais de pool contendo 10, 40 e 100µg de proteínas de líquido de pacientes com meningite meningocócica, respectivamente. Para a focalização isoeletrica, proteínas do líquido de pacientes com meningite foram aplicados em fitas de IPG de sete centímetros com gradiente de separação não linear de pH 3-10. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% e coradas com Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Broad-Range* (Bio-Rad).

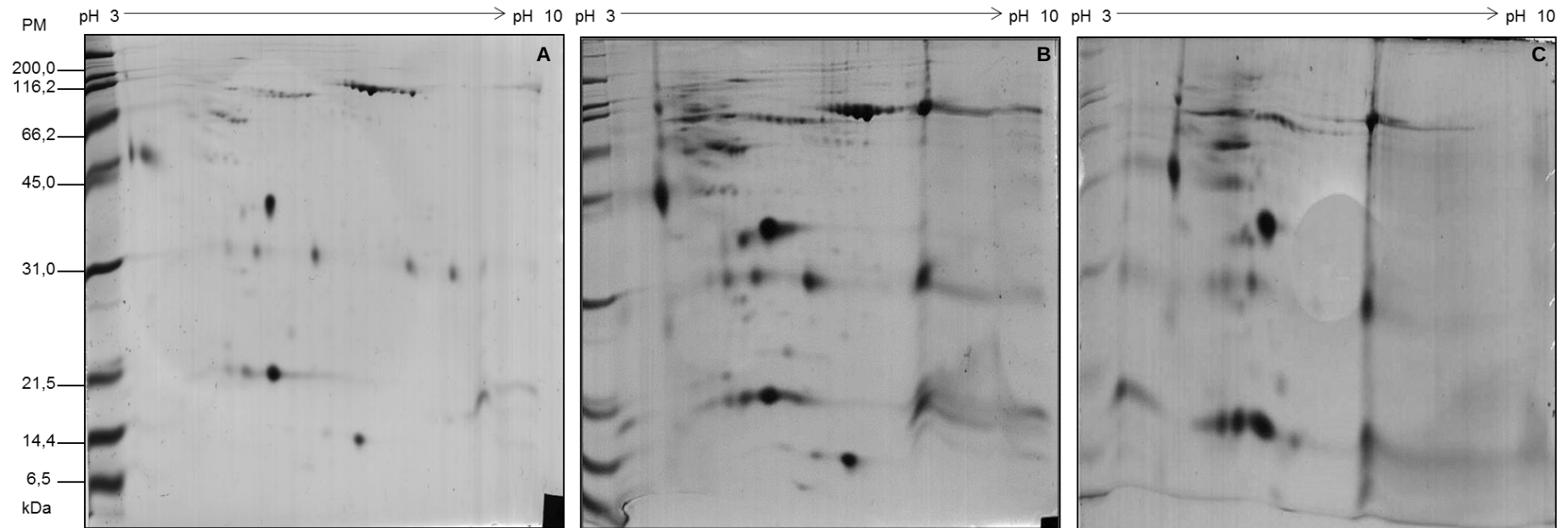


Figura 23: Géis bidimensionais de *pool* de proteínas do líquido de pacientes com meningite viral. Os painéis A, B e C correspondem aos géis bidimensionais de pool contendo 10, 40 e 100µg de proteínas de líquido de pacientes com meningite viral, respectivamente. Para a focalização isoeletrica, proteínas do líquido de pacientes com meningite foram aplicados em fitas de IPG de sete centímetros com gradiente de separação não linear de pH 3-10. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% e coradas com Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Broad-Range* (Bio-Rad).

Dos 695 *spots* proteicos submetidos à espectrometria de massas, 553 (80%) foram identificados e correspondem a 131 proteínas diferentes. Destas, 37 proteínas correspondem a *spots* que pertencem aos subconjuntos interseção das meningites pneumocócica, meningocócica ou viral. Estes *spots* proteicos que foram identificados estão listados no **Apêndice I**. O segundo objetivo deste trabalho é analisar a distribuição, no interatoma humano, das proteínas associadas às meningites para o melhor entendimento dos mecanismos patofisiológicos relacionados à doença e sugestão de novos alvos terapêuticos. Por isso, além dos *spots* pertencentes aos subconjuntos interseção do grupo de pacientes com meningite e ausentes nos conjuntos união das outras etiologias da doença ou de indivíduos controles, buscou-se a identificação de todos os *spots* dos conjuntos união de cada etiologia de meningite.

A maioria dos *spots* únicos dos subconjuntos interseção de cada etiologia de meningite foi descartada como potencial biomarcador, após a identificação por espectrometria de massas, por se tratar de *spots* cuja proteína identificada foi também encontrada em outros *spots* dos géis bidimensionais. A mesma proteína pode estar presente em mais de um *spot* possivelmente devido à ocorrência de modificações pós-traducionais, tais como carbonilação, fosforilação e metilação e a proteólise *in vivo* (217), via proteassoma e lisossoma, como revisado por (218). Por exemplo, os dois *spots* únicos do subconjunto interseção de meningite pneumocócica (**Figura 17**) correspondem às proteínas transtiretina e α -1-antitripsina, que também foram identificadas para todas as etiologias de meningite em outros *spots*. Desse modo, somente dois *spots* considerados únicos do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica foram utilizados para compor o modelo preditivo para as meningites (**m.17** e **m.25**). Além destes, cinco *spots* pertencentes aos subconjuntos interseção de meningite pneumocócica (**p.16**, **p.20** e **p.21**) e de meningite meningocócica (**m.29** e **m.31**) foram selecionados utilizando-se uma matriz de presença (1) ou ausência (0) composta pela lista de todas as proteínas correspondentes aos *spots* pertencentes aos subconjuntos interseção identificadas por espectrometria de massas (**Tabelas 7-9**). Nesta matriz, as proteínas foram classificadas como presentes ou ausentes para cada subconjunto interseção e conjunto união das etiologias de meningite ou controles. Portanto, esta matriz permitiu a seleção dos cinco *spots* que, juntamente

com os dois *spots* únicos pertencentes ao subconjunto interseção de meningite meningocócica, correspondem às quatro proteínas utilizadas para construção do modelo preditivo diagnóstico das meningites, apresentado na seção seguinte do presente trabalho.

Trabalhos anteriores investigaram a presença de citocinas e quimiocinas inflamatórias no líquido de pacientes com meningite, identificando, por exemplo, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10, quimiocinas da família CXC (IL-8) e fatores de crescimento (135-139). Nenhuma destas proteínas foi identificada no presente estudo. Isto pode ser devido à ligação destas proteínas a outras proteínas mais abundantes (e.g. albumina) que foram depletadas na etapa de processamento do líquido (219, 220).

Jesse e colaboradores (197) realizaram análise proteômica comparativa do líquido de pacientes com meningite bacteriana e viral. Nesse estudo, Jesse e colaboradores incluíram pacientes com meningite causada por quatro agentes etiológicos bacterianos distintos (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* e *Staphylococci aurei*), mas analisaram os perfis proteicos de *pools* de amostras em conjunto formando um grupo único de pacientes com meningite bacteriana. Dentre as seis proteínas selecionadas como candidatas a marcadores para o diagnóstico diferencial das meningites, três também foram identificadas no presente estudo (haptoglobina, fibrinogênio de cadeia β e prostaglandina-D-sintase). Entretanto, no presente estudo, estas proteínas pertenciam aos conjuntos união de grupos de pacientes com meningites e, portanto, excluídas da seleção de candidatos a biomarcadores das meningites. Haptoglobina foi identificada nos conjuntos união do grupo de pacientes com MP, MM e MV. Fibrinogênio de cadeia β foi identificado nos conjuntos união do grupo de pacientes somente com meningite bacteriana e prostaglandina-D-sintase foi identificada apenas no conjunto união do grupo de pacientes com meningite viral. A proteína GFAP que foi selecionada e validada por ensaio imunoenzimático por Jesse e colaboradores não foi encontrada no presente estudo, possivelmente devido à baixa quantidade (0,5 μ g) de proteína utilizada para a confecção dos géis bidimensionais na etapa de definição dos conjuntos união de *spots* de cada grupo investigado.

Goonetilleke e colaboradores (199) investigaram proteínas do líquido de pacientes sobreviventes ou que evoluíram para óbito devido à meningite pneumocócica. Neste trabalho, perfis proteicos de *pool* de amostras de líquido de pacientes com meningite pneumocócica, sobreviventes ou óbitos, foram comparados

entre si e com perfil proteicos das amostras de líquido do grupo de indivíduos normais. Esses autores relataram que mais de 2.400 proteínas identificadas são diferencialmente expressas como resultado da meningite. Dentre as proteínas apresentadas por Goonetilleke e colaboradores, 26% foram também identificadas no presente estudo, sendo uma selecionada como marcador da meningite, o componente C3 do sistema do complemento. Esta proteína teve seu nível de expressão diminuído em pacientes que evoluíram para óbito devido à meningite pneumocócica, o que será discutido na próxima seção do presente trabalho. As demais proteínas comumente identificadas por Goonetilleke e pelo presente estudo pertenciam aos conjuntos união do grupo de pacientes com meningite pneumocócica, meningocócica ou viral.

Tabela 7: Matriz dos *spots* do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite pneumocócica.

<i>Spot</i>	Proteína	<i>Spots</i>					<i>gi</i>	Revisado após identificação proteica				
		$\cap$ MM	$\cap$ MV	U MM	U MV	U Ctrl		$\cap$ MM	$\cap$ MV	U MM	U MV	U Ctrl
p.1	α -2-HS-glicoproteína	0	0	0	0	1	112910	0	0	1	1	1
p.2	α -1-antitripsina	0	0	0	0	1	6137432	1	1	1	1	1
p.3	α -1-antitripsina	0	0	1	1	1	6137432	1	1	1	1	1
p.4	α -1-antitripsina	0	0	1	1	1	6137432	1	1	1	1	1
p.5	α -1-antitripsina	0	0	0	0	0	6137432	1	1	1	1	1
p.6	α -1 H Tro	1	0	1	1	1	223069	1	0	1	0	1
p.7	α -1-antitripsina	0	0	1	1	1	6137432	1	1	1	1	1
p.8	Hemopexina	0	0	1	1	1	386789	1	1	1	1	1
p.9	Hemopexina	0	0	1	1	1	386789	1	1	1	1	1
p.10	Hemopexina	0	0	1	1	1	386789	1	1	1	1	1
p.11	Albumina	0	0	1	1	1	28592	1	0	1	1	1
p.12	não identificado	0	0	1	1	1	-	0	0	1	1	1
p.13	Transferrina	0	0	1	1	1	115394517	1	1	1	1	1
p.14	Transferrina	0	0	1	1	1	115394517	1	1	1	1	1
p.15	Transferrina	0	0	1	1	1	115394517	1	1	1	1	1
p.16	Componente C3	1	0	1	0	1	179665	1	0	1	0	1
p.17	Haptoglobina	0	0	1	1	1	306882	1	0	1	1	1
p.18	Haptoglobina	0	0	1	1	1	306882	1	0	1	1	1
p.19	Haptoglobina	0	0	1	1	1	306882	1	0	1	1	1
p.20	C-reativa	1	0	1	0	1	1942435	1	0	1	0	1
p.21	Apolipoproteína AI	1	0	1	1	0	90108664	1	0	1	1	0
p.22	Transtiretina	1	0	1	0	1	17942890	1	1	1	1	1
p.23	Transtiretina	0	0	0	0	0	17942890	1	1	1	1	1

A numeração dos *spots* (**p.1** a **p.23**) é a mesma usada na identificação por MS/MS como listado nas tabelas do Apêndice I.

$\cap$: subconjunto interseção; U: conjunto união; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; Ctrl: controle.

Tabela 8: Matriz dos *spots* do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica.

<i>Spot</i>	Proteína	<i>Spots</i>					<i>gi</i>	Revisado após identificação proteica				
		n MP	n MV	U MP	U MV	U Ctrl		n MP	n MV	U MP	U MV	U Ctrl
m.1	Ceruloplasmina	0	0	1	0	1	1620909	0	0	0	1	1
m.2	α -1-B-Glicoproteína	0	0	1	0	0	69990	0	0	1	1	1
m.3	α -1-B-Glicoproteína	0	0	1	1	1	69990	0	0	1	1	1
m.4	Receptor de célula T cadeia β	0	0	1	0	0	78101492	0	0	1	1	0
m.5	Hemopexina	0	0	1	0	1	386789	1	1	1	1	1
m.6	Hemopexina	0	0	1	1	1	386789	1	1	1	1	1
m.7	Hemopexina	0	0	0	1	1	386789	1	1	1	1	1
m.8	Hemopexina	0	0	1	1	1	386789	1	1	1	1	1
m.9	Receptor de célula T cadeia β	1	1	1	1	0	78101492	1	1	1	1	0
m.10	Transferrina	1	1	1	1	1	115394517	1	1	1	1	1
m.11	Transferrina	1	1	1	1	0	115394517	1	1	1	1	1
m.12	Transferrina	1	1	1	1	1	115394517	1	1	1	1	1
m.13	Transferrina	1	1	1	1	1	115394517	1	1	1	1	1
m.14	Transferrina	1	0	1	0	0	115394517	1	1	1	1	1
m.15	α -1 antitripsina	1	0	1	0	1	177933	1	0	1	0	1
m.16	α -1-antitripsina	1	1	1	1	0	6137432	1	1	1	1	1
m.17	Cininogênio	0	0	0	0	0	4504893	0	0	0	0	0
m.18	Proteína ligadora de vitamina D	1	1	1	1	0	181482	1	1	1	1	1
m.19	Proteína ligadora de vitamina D	1	0	1	0	0	181482	1	1	1	1	1
m.20	α -1-antitripsina	0	0	0	0	0	6137432	1	1	1	1	1
m.21	α -1-antitripsina	1	1	1	1	0	6137432	1	1	1	1	1
m.22	α -1-Glicoproteína ácida	0	0	0	0	0	112877	1	1	1	1	1
m.23	α -1-Glicoproteína ácida	1	0	1	0	0	112877	1	1	1	1	1
m.24	Haptoglobina	0	0	0	1	0	306882	1	0	1	1	1
m.25	Componente C3	0	0	0	0	0	179665	1	0	1	0	1
m.26	Zn- α -2-glicoproteína	0	0	1	1	1	38026	0	0	1	1	1

Spot	Proteína	∩ MP	∩ MM	U MP	U MM	U Ctrl	gi	∩ MP	∩ MM	U MP	U MM	U Ctrl
m.27	Haptoglobina	1	0	1	1	0	306882	1	0	1	1	1
m.28	Haptoglobina	1	0	1	1	1	306882	1	0	1	1	1
m.29	C-reativa	0	0	1	0	0	1942435	0	0	1	0	1
m.30	Apolipoproteína A-I	0	0	0	0	0	90108664	1	0	1	1	0
m.31	Apolipoproteína A-I	1	0	1	1	0	90108664	1	0	1	1	0
m.32	Transtiretina	0	1	0	1	0	17942890	1	1	1	1	1
m.33	Transtiretina	0	1	0	1	0	17942890	1	1	1	1	1

A numeração dos spots (**m.1** a **m.33**) é a mesma usada na identificação por MS/MS como listado nas tabelas do Apêndice I.

∩: subconjunto interseção; U: conjunto união; MP: meningite pneumocócica; MV: meningite viral; Ctrl: controle.

Tabela 9: Matriz dos *spots* do subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite viral.

<i>Spot</i>	Proteína	<i>Spots</i>					<i>gi</i>	Revisado após identificação proteica				
		n MP	n MM	U MP	U MM	U Ctrl		n MP	n MM	U MP	U MM	U Ctrl
v.1	não identificado	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
v.2	não identificado	0	0	0	1	0	-	0	0	0	1	0
v.3	não identificado	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
v.4	não identificado	0	0	1	1	1	-	0	0	1	1	1
v.5	produto não nomeado	0	0	1	1	1	22761380	0	0	1	1	1
v.6	Hemopexina	0	0	1	1	1	386789	1	1	1	1	1
v.7	não identificado	0	0	1	1	1	-	0	0	1	1	1
v.8	Hemopexina	0	0	1	1	0	386789	1	1	1	1	1
v.9	produto não nomeado	0	0	1	1	1	22761380	0	0	1	1	1
v.10	Transferrina	0	0	0	1	1	110590597	1	1	1	1	1
v.11	Transferrina	0	0	1	1	1	110590597	1	1	1	1	1
v.12	Transferrina	0	0	1	1	1	110590597	1	1	1	1	1
v.13	Transferrina	0	0	1	1	1	110590597	1	1	1	1	1
v.14	não identificado	0	0	1	1	1	-	0	0	1	1	1
v.15	Transferrina	0	0	1	1	1	110590597	1	1	1	1	1
v.16	Transferrina	0	0	1	0	1	110590597	1	1	1	1	1
v.17	α -1-antitripsina	0	0	0	1	1	177831	1	1	1	1	1
v.18	não identificado	0	0	1	0	1	-	0	0	0	0	1
v.19	Proteína ligadora de vitamina D	0	0	1	0	1	181482	1	1	1	1	1
v.20	Proteína ligadora de vitamina D	0	0	1	0	1	181482	1	1	1	1	1
v.21	α -1-Glicoproteína ácida	0	0	0	0	1	112877	1	1	1	1	1
v.22	Transtiretina	0	0	1	0	1	17942890	1	1	1	1	1
v.23	Transtiretina	0	0	0	1	1	17942890	1	1	1	1	1
v.24	Prostaglandina D sintase	0	0	0	0	1	283806778	0	0	0	1	1
v.25	Prostaglandina D sintase	0	0	0	0	0	283806778	0	0	0	1	1

Spot	Proteína	∩ MP	∩ MM	U MP	U MM	U Ctrl	gi	∩ MP	∩ MM	U MP	U MM	U Ctrl
v.26	não identificado	0	0	0	1	0	-	0	0	0	1	0
v.27	Transtiretina	0	0	0	0	0	17942890	1	1	1	1	1

A numeração dos spots (v.1 a v.27) é a mesma usada na identificação por MS/MS como listado nas tabelas do Apêndice I.

∩: subconjunto interseção; U: conjunto união; MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; Ctrl: controle.

5.3.2 Seleção de candidatos a biomarcadores para o diagnóstico diferencial das meningites

As cinco proteínas selecionadas foram combinadas para compor um modelo preditivo qualitativo capaz de diferenciar as meningites pneumocócica e meningocócica entre si e da meningite viral ou controles (**Tabela 10** e **Figura 24**). Os dados de identificação destas proteínas por MS/MS estão descritos na **Tabela 11**. A ausência da proteína apolipoproteína A-I (*spots* **p.21**, **m.30** e **m.31**) está associada às condições de ausência de infecção no SNC (grupo controle) ou meningite viral. Os *spots* correspondentes a apolipoproteína A-I ocorrem no conjunto união do grupo de meningite viral, mas não no conjunto união do grupo controle, de modo que a ausência desta proteína pode indicar qualquer uma destas duas condições, e sua presença implica nas condições de meningite bacteriana ou viral. O *spot* correspondente à proteína c-reativa foi identificado no conjunto união do grupo controle, mas não no conjunto união do grupo de meningite viral. Ainda que, isoladamente, a presença da proteína c-reativa possa indicar à condição controle, esta pode ser excluída pela presença da proteína apolipoproteína A-I. Sendo assim, utilizou-se o componente C3 do sistema complemento (*spots* **p.16** e **m.25**) ou a c-reativa (*spots* **p.20** e **m.29**), uma vez que a ausência de qualquer uma destas proteínas define a condição de meningite viral. O componente C3 do sistema do complemento caracteriza a condição de meningite bacteriana sem definição do agente etiológico, sendo que seu *spot* correspondente foi identificado nos dois subconjuntos interseção dos grupos das meningites bacterianas e não no conjunto união do grupo com meningite viral. Para a definição do agente etiológico da meningite bacteriana propõe-se a proteína cininogênio. A presença da proteína cininogênio (*spot* **m.17**) está associada à meningite meningocócica, enquanto sua ausência indica meningite pneumocócica (**Figura 24**). A proteína cininogênio foi encontrada somente no subconjunto interseção de meningite meningocócica e seu *spot* correspondente não pertence aos conjuntos união das demais etiologias de meningite nem do grupo controle. A partir destes resultados, foi elaborado o modelo preditivo descrito na **Figura 24**, no qual a presença ou ausência das proteínas descritas acima deve ser analisada sequencialmente.

Tabela 10: Matriz de presença/ ausência das proteínas selecionadas para composição do modelo preditivo qualitativo.

Spot	Uniprot	gi	DESCRIÇÃO	$\cap$ MP	$\cap$ MM	$\cap$ MV	U MP	U MM	U MV	U Ctrl
m.30 / m.31 / p.21	P02647	90108664	Apolipoproteína A-I	1	1	0	1	1	1	0
m.29 / p.20	P02741	1942435	C-reativa	1	1	0	1	1	0	1
p.16 / m.25	P01024	179665	Componente C3	1	1	0	1	1	0	0
m.17	P01042	4504893	Cininogênio	0	1	0	0	1	0	0

$\cap$: subconjunto interseção; U: conjunto união; MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle.

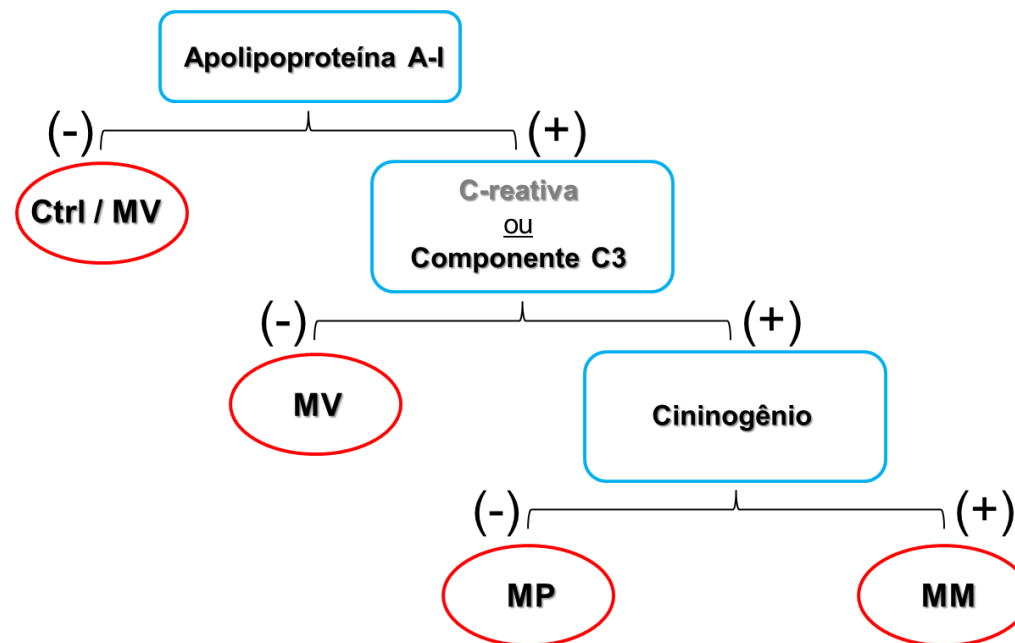


Figura 24: Modelo preditivo qualitativo de biomarcadores proteicos da meningite. MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle; (+): presença; (-): ausência.

A proteína apolipoproteína A-I, maior componente da lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma, promove o efluxo de colesterol dos tecidos para o fígado e tem importante papel na formação de ésteres de colesterol no plasma e na regulação da inflamação (221). A apolipoproteína A-I pode ser sintetizada localmente dentro do SNC (222). Não se sabe quais estruturas cerebrais produzem esta proteína, embora alguns trabalhos tenham demonstrado a síntese de apolipoproteína A-I em células endoteliais microvasculares de cérebro de porcos *in vitro* (223, 224). Estas células endoteliais cerebrais participam ativamente de diversos processos cerebrovasculares observados nas meningites e constituem a BHE junto com outras estruturas. Em um estudo recente, foi demonstrada a inibição de apolipoproteína A-I pelo quimioterápico doxorrubicina utilizado no tratamento do câncer, o que resultou na elevação dos níveis periféricos de TNF- α (225). De maneira análoga, a apolipoproteína A-I, no SNC poderia ter um efeito protetor durante a meningite pela atenuação da atividade de citocinas pró-inflamatórias indutoras de dano neuronal. Por outro lado, o aumento da sua concentração no líquido de macacos infectados com poliovírus relaciona-se diretamente à severidade do dano neurológico nestes animais (222). Portanto, o papel da proteína apolipoproteína A-I no SNC ainda não está claro.

A proteína c-reativa foi assim nomeada por sua capacidade de se ligar e reagir com a proteína C presente no polissacarídeo capsular do patógeno *S. pneumoniae* (226). C-reativa é uma proteína sérica produzida pelo fígado e secretada durante reações inflamatórias agudas (227). Diversos estudos demonstram níveis aumentados da proteína c-reativa no líquido e soro de pacientes com meningite bacteriana em comparação com pacientes com meningite viral ou indivíduos controles (226, 228-230). Singh e colaboradores (231) demonstraram, através do teste de aglutinação em látex, que 84% das amostras de líquido de pacientes com meningite bacteriana apresentavam níveis aumentados da proteína c-reativa, enquanto todos os pacientes com meningite asséptica tinham níveis líquidos considerados normais dessa proteína. No presente trabalho, a proteína c-reativa foi detectada somente no líquido de pacientes com meningite bacteriana, sendo prevista como proteína marcadora negativa para pacientes com meningite viral. É provável que a concentração desta proteína no líquido dos pacientes com

meningite viral seja inferior ao limite de detecção da metodologia proteômica empregada no presente estudo.

No presente trabalho, o componente C3 do sistema do complemento foi encontrado somente em líquido de pacientes com meningite bacteriana, sendo considerado um marcador positivo desta doença. De fato, já foram relatadas altas concentrações de C3 no líquido de pacientes com meningite bacteriana em comparação a pacientes com meningite viral e controles sem infecção no SNC (232). Diante dos resultados, os autores concluem que a concentração do C3 no líquido pode ter relevância clínica no diagnóstico diferencial das meningites bacteriana e asséptica com alta sensibilidade (100%) e especificidade (95,2%).

O componente C3 foi sugerido como um marcador de bom prognóstico para meningite pneumocócica uma vez que esta proteína ocorre em menores concentrações no líquido de pacientes com meningite pneumocócica que evoluem para óbito do que nos que sobrevivem à doença (233). Os níveis reduzidos de C3 em casos fatais de meningite pneumocócica podem ser explicados pelo maior consumo dessa proteína em decorrência da severidade da doença que é acompanhada pela carga bacteriana mais alta (233). A redução da atividade de C3 na resposta ao patógeno prejudica os processos de fagocitose e a liberação de mediadores pró-inflamatórios da resposta imune inata que podem intensificar a septicemia e levar à morte do paciente (234). O C3 é um regulador chave da resposta imune na infecção por *S. pneumoniae* induzindo o influxo de leucócitos para dentro do SNC. Esse processo é mediado pelo aumento de citocinas inflamatórias. Esta ideia é corroborada por um estudo feito com camundongos deficientes em C3 infectados com injeção intracisternal de *S. pneumoniae* que apresentaram uma resposta imune atenuada no espaço intratecal com menor influxo de leucócitos, além de uma expressão consideravelmente reduzida de citocinas inflamatórias importantes para a modulação desse processo como IL-6, IL-1 β e L-seletina (235). Da mesma forma, os resultados do presente trabalho demonstram a ausência de C3 no líquido de pacientes com meningite viral cuja patofisiologia também está associada a menor pleocitose, geralmente, linfocítica (68), além de serem observados níveis reduzidos de citocinas no líquido em comparação com a meningite bacteriana (136, 137).

O cininogênio é uma glicoproteína multifuncional precursora de cinina que é produzida por diversas estruturas no organismo, dentre elas o cérebro (236, 237) e,

quando ativada, participa de processos inflamatórios e vasculares (238). Os peptídeos ativos de cinina se ligam a dois tipos de receptores: B1, que é escasso em condições normais, embora seus níveis sejam rapidamente aumentados durante processos patofisiológicos; e B2 que é expresso em diversas condições fisiológicas (239-243). Estímulos inflamatórios, como LPS de bactérias gram-negativas ativam o sistema gerador de cinina no plexo coróide via mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β e TNF- α , além de COX-2 provocando aumento considerável de cininogênio nas células epiteliais do plexo (244). O reconhecimento do LPS por essas células epiteliais sugere que o plexo coróide é capaz de reconhecer infecções bacterianas sistêmicas e modular a produção de mediadores pró-inflamatórios que aumentam a secreção de cininogênio (245). A ativação de cininogênio por LPS corrobora os resultados do presente trabalho, que demonstraram a presença dessa proteína somente no líquido de todos os pacientes com meningite meningocócica, doença causada pela bactéria gram-negativa *N. meningitidis*.

A produção de bradiginina (ou cinina) pelo precursor cininogênio no cérebro parece influenciar processos cerebrovasculares de grande importância na meningite bacteriana. A bradiginina aumenta a permeabilidade da BHE via produção de NO após ativação do receptor B2 endotelial (238). De fato, o controle da permeabilidade vascular é essencial para a manutenção da integridade do SNC. Por sua vez, o receptor B1 parece estar associado ao processo de lesão cerebral mediado por NO (246), mas o mecanismo respectivo ainda não foi totalmente esclarecido.

O presente trabalho é o primeiro a relatar a presença da proteína cininogênio no líquido de pacientes com meningite meningocócica, embora diversos processos biológicos já associados a esta proteína estejam diretamente relacionados à patofisiologia das meningites bacterianas (238, 246-248).

O presente trabalho é o primeiro a comparar os perfis proteicos individuais de pacientes com meningite pneumocócica, meningocócica ou viral com indivíduos sem infecção no SNC. As réplicas técnicas dos perfis proteicos de cada paciente também foram analisadas individualmente. Somente foram considerados os *spots* dos subconjuntos interseção de cada etiologia de meningite para seleção dos biomarcadores. Estes *spots* correspondem a proteínas identificadas e que tiveram suas localizações subcelulares definidas (resultado apresentado na seção VI.4), sendo em sua maioria extracelulares (71%). As cinco proteínas selecionadas para compor o modelo preditivo qualitativo são todas extracelulares, sugerindo a sua

participação direta nos processos patofisiológicos associados às meningites. Além disso, os pacientes incluídos neste estudo são de diferentes grupos etários (infantes, crianças e adultos) e suas amostras de líquido foram colhidas em diferentes momentos ao longo do curso da doença. Outro fator relevante do presente trabalho é que as amostras destes pacientes são provenientes de dois hospitais de regiões distintas do país (sudeste e nordeste) e, possivelmente, representam diferentes *backgrounds* genéticos do hospedeiro. Desse modo, todas as etapas do delineamento experimental supracitadas contribuem para a confiabilidade dos resultados encontrados no presente trabalho.

Tabela 11: Identificação dos *spots* correspondentes às proteínas selecionadas como biomarcadores pelo modelo preditivo qualitativo

(continua)

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	Score do íon individual	Peptídeos	<i>m/z</i> value
p.16	Componente C3	gi 179665	47 (43) 27 (43) 45 (43)	K. TIYTPGSTVLYR. I R. IPIEDGSGEVLSR. K R. LVAYYTLIGASGQR. E	1370.7386 1470.7778 1511.8160
m.25	Componente C3	gi 179665	13 (43) 20 (43)	K. SGSDEVQVGQQR. T K. VYAYYNLEESCTR. F + Carbamidomethyl (C)	1289.6248 1667.7285
p.20	C-reativa	gi 1942435	63 (43) 16 (43) 103 (43)	R. GYSIFSYATKR. Q K. RQDNEILIFWSK. D K. YEVQGEVFTKPQLWP.	1136.5846 1548.8040 1820.8853
m.29	C-reativa	gi 1942435	72 (70) 49 (70) 119 (70)	R. GYSIFSYATKR. R K. RQDNEILIFWSK. D K. YEVQGEVFTKPQLWP.	1136.5562 1548.8180 1820.8986
p.21	Apolipoproteína - AI	gi 90108664	63 (43) 55 (43) 69 (43) 61 (43) 61 (43) 66 (43) 91 (43)	K. AKPALEDLR. Q K. LSPLGEEMR. D R. QGLLPVLESFK. V + Gln ->pyro-Glu (N-term Q) K. VQPYLDDFQK. K K. WQEEMELYR. Q R. THLAPYSDELRL. Q K. VSFLSALEEYTK. K	1012.6161 1031.5541 1213.7053 1252.6372 1283.5863 1301.6615 1386.7219

			113 (43)	R. DYVSQFEGSALGK. Q	1400.6720
			95 (43)	R. VKDLATVYVDVLK. D	1462.8552
			136 (43)	K. LLDNWDSVTSTFSK. L	1612.7783
m.31	Apolipoproteína - AI	gi 90108664	38 (43)	R. THLAPYSDEL R. Q	1301.6545
			89 (43)	R. DYVSQFEGSALGK. Q	1400.6689
m.17	Cininogênio	gi 4504893	38 (43)	R. QVVAGLNFR. I + Gln->pyro-Glu	986.5857
			56 (43)	K. YFIDFVAR. E	1030.5787
			74 (43)	K. YNSQNQSNNQFVLYR. I	1874.9221

m/z: razão massa carga; o número entre parênteses indica o *score* da análise MS/MS.

5.4 Previsão da localização celular das proteínas identificadas

A localização celular das proteínas identificadas por espectrometria de massas foi prevista utilizando-se suas respectivas sequências de aminoácidos obtidas no banco de dados do NCBI, em formato *fasta*. Essas sequências foram submetidas à versão *web* do *software* SherLoc 2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc2>).

Os resultados mostraram que a maioria das proteínas identificadas nos conjuntos união das meningites foi prevista como citoplasmáticas (46%), ou extracelulares (45%), podendo ser ainda nucleares (3%), de membranas plasmáticas (4%) ou mitocondriais (2%). Ademais, as proteínas identificadas que pertencem ao subconjunto interseção para as meningites foram previstas somente como extracelulares (71%), ou citoplasmáticas (29%) (**Figura 25**).

Uma das mais distintas características das células eucarióticas é a compartimentalização de proteínas. A localização de uma proteína muitas vezes é um passo essencial para determinar a sua função.

O fato dos subconjuntos interseção conterem predominantemente proteínas extracelulares (e algumas citoplasmáticas) reforça a ideia de que as proteínas avaliadas para seleção dos biomarcadores para as meningites participam dos processos fisiológicos da resposta do hospedeiro à infecção bacteriana.

Por outro lado, a ocorrência de proteínas nucleares e mitocondriais apenas nos conjuntos união das meningites sugere tratar-se de proteínas ocasionalmente liberadas para o meio extracelular em decorrência da morte de neurônios, glia, ou células do infiltrado inflamatório durante o curso das meningites.

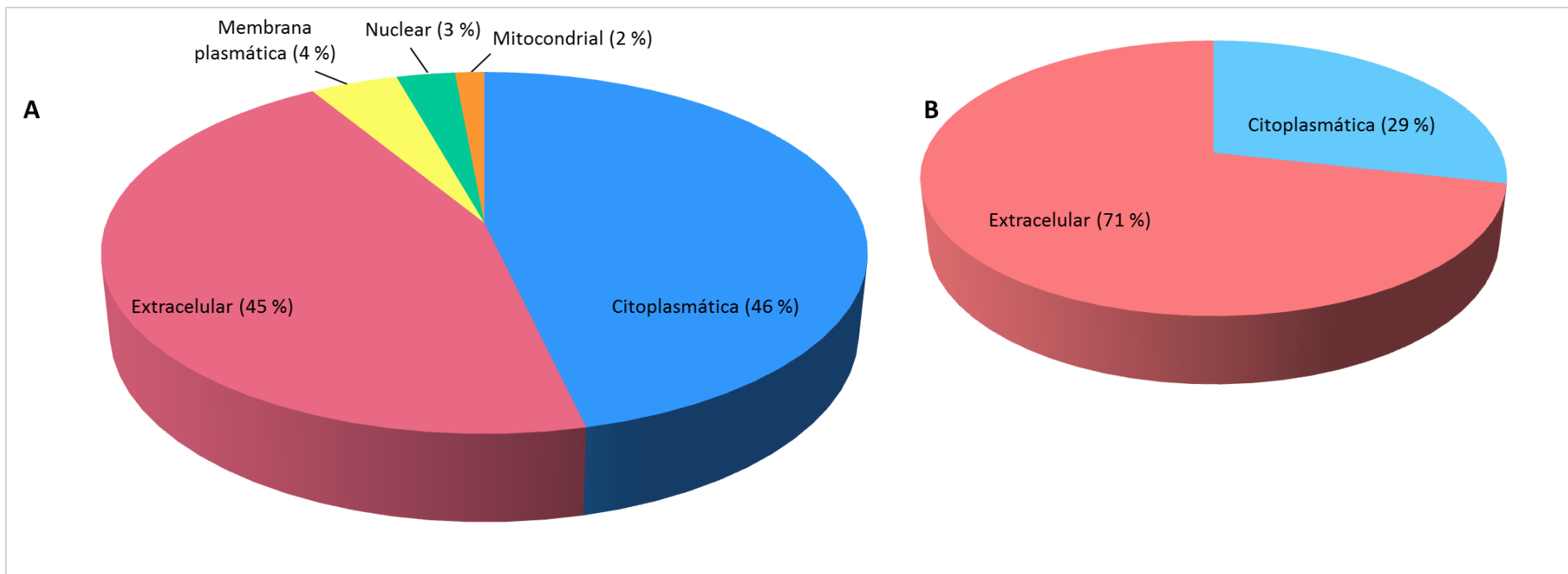


Figura 25: Previsão da localização celular das proteínas identificadas que compõem os conjuntos união e subconjuntos interseção da meningite. A) previsão de localização celular das proteínas que compõem os conjuntos união das meningites (n = 131); B) previsão de localização celular das proteínas que compõem os subconjuntos interseção das meningites (n = 37).

5.5 Previsão e análise de vias metabólicas e de sinalização canônicas e processos biológicos associados com as meningites

O *software* MetaCore™ (GeneGo Inc., St. Joseph, MI, EUA) foi utilizado para se identificarem vias canônicas de metabolismo ou de sinalização, processos biológicos GeneGo e *Gene Ontology* (GO: www.geneontology.org) e doenças associadas aos conjuntos de proteínas identificadas por espectrometria de massas. Além das vias metabólicas e de sinalização consideradas canônicas, o banco de dados do MetaCore™ contém um acervo próprio de informações manualmente curadas sobre interações biológicas citadas na literatura científica. Esse banco contém informações sobre interações envolvendo mais de 90% das proteínas humanas com função conhecida. As análises de enriquecimento (EA) realizadas seguindo as instruções do fabricante do *software* tomaram como dados de entrada os identificadores únicos Swiss Prot das proteínas identificadas a partir dos *spots* dos conjuntos união, ou dos subconjuntos interseção dos grupos com MP, MM, e MV, respectivamente. Experimentos independentes foram realizados para os conjuntos união e os subconjuntos interseção. Como esperado, os resultados relacionados à lista de proteínas identificadas dos *spots* dos subconjuntos interseção estavam contidos nos achados utilizando-se a lista de proteínas identificadas a partir dos *spots* que formam os conjuntos união, sendo estes últimos mais complexos devido ao maior número de proteínas investigadas e, por isso, apresentados nesta seção.

5.5.1 Vias metabólicas e de sinalização associadas às meningites

As vias canônicas mais fortemente representadas pelas proteínas dos conjuntos união de MP, MM e MV foram àquelas relacionadas à coagulação sanguínea e ao papel da transcrição do gene Akt na ativação do fator induzido por hipóxia-1 (HIF1) (**Figuras 26, 28**). O processo de coagulação sanguínea foi associado, com alta probabilidade, às meningites bacterianas, sobretudo à forma

meningocócica (valor de p : $6,38 \times 10^{-6}$). Esta última também foi fortemente associada ao papel da transcrição do gene Akt na ativação do HIF-1 (valor de p : $3,29 \times 10^{-3}$).

Os processos de ativação e degranulação de plaquetas e a resposta inflamatória aguda parecem estar relacionados à patofisiologia das meningites bacterianas e virais, como sugerido na distribuição de processos celulares *Gene Ontology* representada pelo MetaCore™ (**Figura 27**).

O início da via extrínseca da coagulação é mediado pelo fator tecidual (TF) (**Figura 28**). O TF forma um complexo com o fator VII e catalisa a conversão do fator X em fator Xa. Este ao se ligar à protrombina, ao fator Va e ao cálcio produz o complexo protrombinase que, por sua vez ativa a produção de trombina (fator IIa) (17, 249). Na conversão de protrombina a trombina o complexo protrombinase atua juntamente com o complexo tenase formado pelo fator X, fator IXa, fator VIIIa e cálcio (249). Assim, a trombina ativa a conversão do fibrinogênio a fibrina, que é uma proteína formadora de coágulo (250) (**Figura 28**). Diversos fatores pertencentes à via da coagulação apresentam concentrações aumentadas em pacientes com meningite bacteriana em comparação àqueles com meningite viral e indivíduos controles. Por exemplo, a concentração de TF está elevada no líquido durante a meningite bacteriana, sugerindo uma maior ativação da via extrínseca da coagulação nesses pacientes (251). Weisfelt e colaboradores (251) demonstraram que o fragmento protrombina (F1+2) e o D-dímero também apresentaram concentrações aumentadas nesta doença, o que indica a produção elevada de trombina e a degradação mais proeminente de coágulos de fibrina, respectivamente (251).

A atividade dos complexos protrombinase e tenase é facilitada pela presença de plaquetas ativadas (252) via fator ativador de plaquetas (PAF) ou trombina (250, 253). A expressão de TF pelos monócitos favorece a formação de coágulos de fibrina (249). A P-seletina auxilia no processo de rolamento dos leucócitos na parede vascular permitindo a adesão dessas células (254). Esta adesão leucocitária ao endotélio é facilitada pelo aumento do fluxo sanguíneo cerebral que ocorre durante a inflamação do SNC (255). O mecanismo molecular desse efeito depende da ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) que é induzido pela ligação de plaquetas ativadas em neutrófilos e células mononucleares (256). Esta interação celular estimula a produção de IL-1 β , IL-8, proteína quimioatrativa do monócito-1 e TNF- α .

(257). Estas citocinas, somadas a IL-6, representam os principais reguladores da resposta inflamatória local e sistêmica (257). Um potencial alvo terapêutico para inibição visando o controle da coagulação intravascular disseminada associada principalmente às meningites bacterianas é o NF- κ B, que comprometeria a expressão de TF pelas células de defesa imune, diminuindo a ativação da cascata extrínseca de coagulação. Dois fármacos podem ser sugeridos para inibição de NF- κ B, o *Menatetrenone* (258) e o *Tiomolibdic acid* (259). O *Menatetrenone* é um composto que forma a vitamina K com potencial atividade antineoplásica. Este composto age modulando a sinalização de algumas tirosinas quinases e inibindo o NF- κ B. Atualmente, este composto encontra-se na fase pré-clínica para terapia de carcinomas hepatocelulares (260). Por sua vez, o *Tiomolibdic acid* é um novo agente anti-tumoral e anti-angiogênese que age através da quelação do cobre e da inibição do NF- κ B. Este fármaco tem sido avaliado para terapia de diversas doenças, como na cirrose (fase clínica III) (261), no neoplasma prostático (fase clínica II) (262) e na doença de Huntington (fase pré-clínica) (263). Ambos os fármacos supracitados tem a capacidade de transpor a BHE e, inclusive, têm sido avaliados quanto sua utilização em doenças e processos neurológicos (264-266). Portanto, propomos a hipótese de que a inibição de NF- κ B com uma dessas duas drogas atenuaria os processos coagulatórios que aumentam a severidade desta doença. Apesar disso, outras proteínas regulatórias podem ter sua expressão prejudicada devido à inibição de NF- κ B.

A atividade procoagulante é regulada por três vias anticoagulantes: antitrombina (AT), sistema da proteína C e inibidor da via do fator tecidual (TFPI) (**Figura 28**), sendo que esses três processos se relacionam diretamente a mecanismos inibitórios da coagulação e modulação da inflamação (250). Contudo, durante a infecção sistêmica ou inflamação severa, a função destas vias é intensamente comprometida.

A antitrombina é o principal inibidor de trombina e do fator Xa e, durante a infecção severa, seus níveis estão consideravelmente reduzidos (249). Isto se deve à síntese prejudicada de antitrombina como resultado da resposta de fase aguda negativa, da degradação pela elastase neutrofílica e do consumo para formação de trombina (249). Outro papel da antitrombina comprometido em estados patológicos é a atenuação da inflamação por sua ligação direta a neutrófilos e outros leucócitos (267). No presente trabalho, a antitrombina III foi identificada no conjunto união do

grupo de pacientes com meningite meningocócica. Apenas o perfil proteico de um dentre os seis pacientes com meningite meningocócica não apresenta o *spot* correspondente a antitrombina. A punção lombar previamente à instalação do processo inflamatório exacerbado poderia explicar a não detecção da antitrombina. Ainda assim, sugere-se a hipótese de que a antitrombina pode exercer um efeito protetor na meningite compensando o aumento dos níveis de trombina para atenuação do processo inflamatório exacerbado no curso da doença (**Figura 28**).

A proteína C, também denominada autoprotrombina IIA, ou fator de coagulação XIV é uma proteína plasmática dependente de vitamina K que, ao se ligar a proteína S receptora, forma a segunda linha de defesa anticoagulante. A proteína C circulante é ativada pelo complexo trombina-trombomodulina e inativa os cofatores Va e VIIIa da coagulação (268) inibindo a produção de trombina (**Figura 28**). Este fato pode, indiretamente, contribuir para a atividade anti-inflamatória da proteína C que, ao inibir a produção de trombina, reduz a ativação de plaquetas e o recrutamento de neutrófilos (249). Em contraste, o sistema da proteína C, assim como a via da antitrombina é prejudicado durante a sepse devido a pelo menos três fatores (269, 270). Primeiramente, a síntese da proteína C é reduzida e as citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 agem reduzindo a expressão de trombomodulina que compromete a ativação da proteína C. Outro fator é o decréscimo da concentração do cofator proteína S livre que também diminui a ativação da proteína C (271).

O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) é um importante inibidor do complexo TF-fator VIIa (249) (**Figura 28**). Este mecanismo não é bem esclarecido, mas sabe-se que doses terapêuticas de TFPI previnem a mortalidade durante a infecção sistêmica por *Escherichia coli* e a inflamação, sugerindo que altas concentrações de TFPI atenuam a coagulação mediada pelo TF (272).

A degradação de coágulos de fibrina, ou fibrinólise, é mediada pela plasmina, forma ativa do plasminogênio, que, por sua vez, é estimulada pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual (tPA) e pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA). tPA e uPA são estimulados por TNF- α e IL-1 β (273). Durante a infecção severa, estas citocinas estimulam o inibidor da ativação de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) que inibe as proteases tPA e uPA resultando na atenuação da fibrinólise (**Figuras 26 e 28**). Consequentemente, a remoção dos coágulos de fibrina é parcial e insuficiente o que contribui para a trombose microvascular (250).

Weisfelt e colaboradores (251) observaram que a ativação da coagulação é mais proeminente no líquido de pacientes com meningite bacteriana em comparação à meningite viral, o que corrobora com os resultados do presente trabalho (**Figuras 26 e 28**). Na meningite bacteriana, o equilíbrio entre a fibrinólise e a coagulação é desregulado em favor desta última, favorecendo o desenvolvimento de complicações cerebrovasculares nesses pacientes. Na meningite, os níveis líquidos de PAI-1 e do complexo trombina-antitrombina (TaT) estão aumentados em comparação a indivíduos saudáveis, embora sejam similares em pacientes com meningite bacteriana e viral (251). A concentração aumentada da antitrombina no líquido dos pacientes com meningite pode explicar a concentração similar de TaT nas duas formas da doença. Entretanto, o presente trabalho identificou a antitrombina III somente no conjunto união do grupo de pacientes com meningite meningocócica, o que corrobora em parte essa hipótese. O aumento de PAI-1 relatado por Weisfelt e colaboradores em pacientes com meningite sugere a inibição da fibrinólise, mesmo que parcial, uma vez que os níveis de tPA e uPA no líquido desses pacientes são consideravelmente superiores aos da PAI-1. Os níveis elevados dos ativadores de plasmina tPA e uPA indicam a ativação da fibrinólise durante a meningite, provavelmente como uma forma de controle dos processos coagulatórios exacerbados observados na doença. Por outro lado, o aumento de PAI-1 no líquido parece correlacionar-se com os níveis elevados de tPA e uPA a fim de modular os eventos fibrinolíticos. Diante disso, propomos a hipótese de que alguns fármacos ativadores da conversão de plasminogênio para plasmina poderiam ser utilizados em pacientes com meningite bacteriana com o objetivo de estimular os eventos fibrinolíticos. Esta ativação poderia equilibrar a ação dos processos coagulatórios e fibrinolíticos relacionados às meningites bacterianas que resultam em complicações cerebrovasculares mais frequentes na meningite pneumocócica (79). Para isso, dois fármacos são sugeridos para ativação do receptor do fator de ativação do tipo uroquinase (uPAR) que contribui para a formação de plasmina via uPA. O fármaco *Alteplase* é um ativador do plasminogênio tecidual produzido a partir da tecnologia do DNA recombinante. Esta droga foi aprovada pela FDA (fase clínica IV) e é utilizada para o tratamento de infarto do miocárdio, embolismo pulmonar e acidente vascular isquêmico. Da mesma forma, o fármaco *Retepase* também aprovado pela FDA (fase clínica IV) ativa o plasminogênio tecidual, sendo utilizado para o tratamento de infarto do miocárdio, além de ser testado (fase clínica II) para a

hemorragia subaracnoide. Propomos, portanto, a hipótese de que o reposicionamento destas duas drogas para o tratamento das meningites poderia aumentar os processos fibrinolíticos que atenuariam os eventos coagulatórios severos associados às meningites bacterianas.

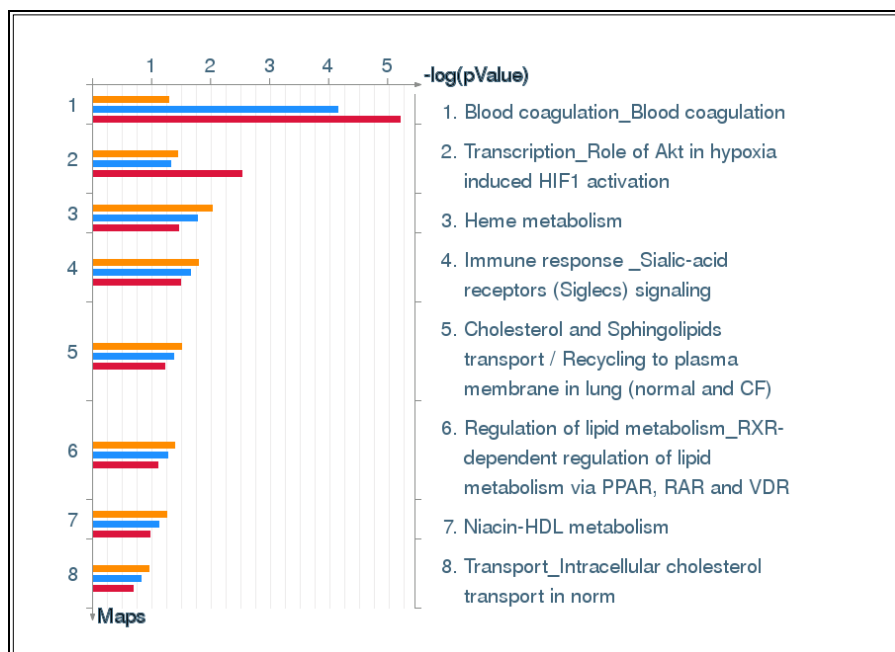


Figura 26: Distribuição das vias canônicas representada pelo GeneGo MetaCore™. Listas das proteínas identificadas a partir do conjunto de *spots* que compõem a união foram usadas como arquivos de entrada. Barra laranja: proteínas do líquido de pacientes com meningite viral; barra azul: proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica; Barra vermelha: proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica.

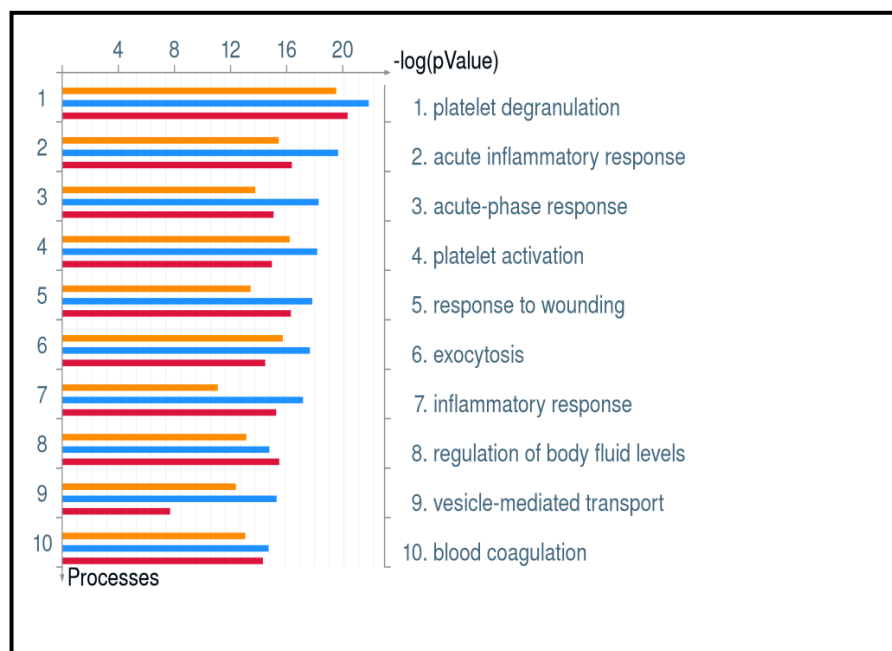


Figura 27: Distribuição de processos celulares Gene Ontology (GO) representado pelo MetaCore™. Listas das proteínas identificadas a partir do conjunto de *spots* que compõem a união foram usadas como arquivos de entrada. Barra laranja: proteínas do líquido de pacientes com meningite viral; barra azul: proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica; Barra vermelha: proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica.

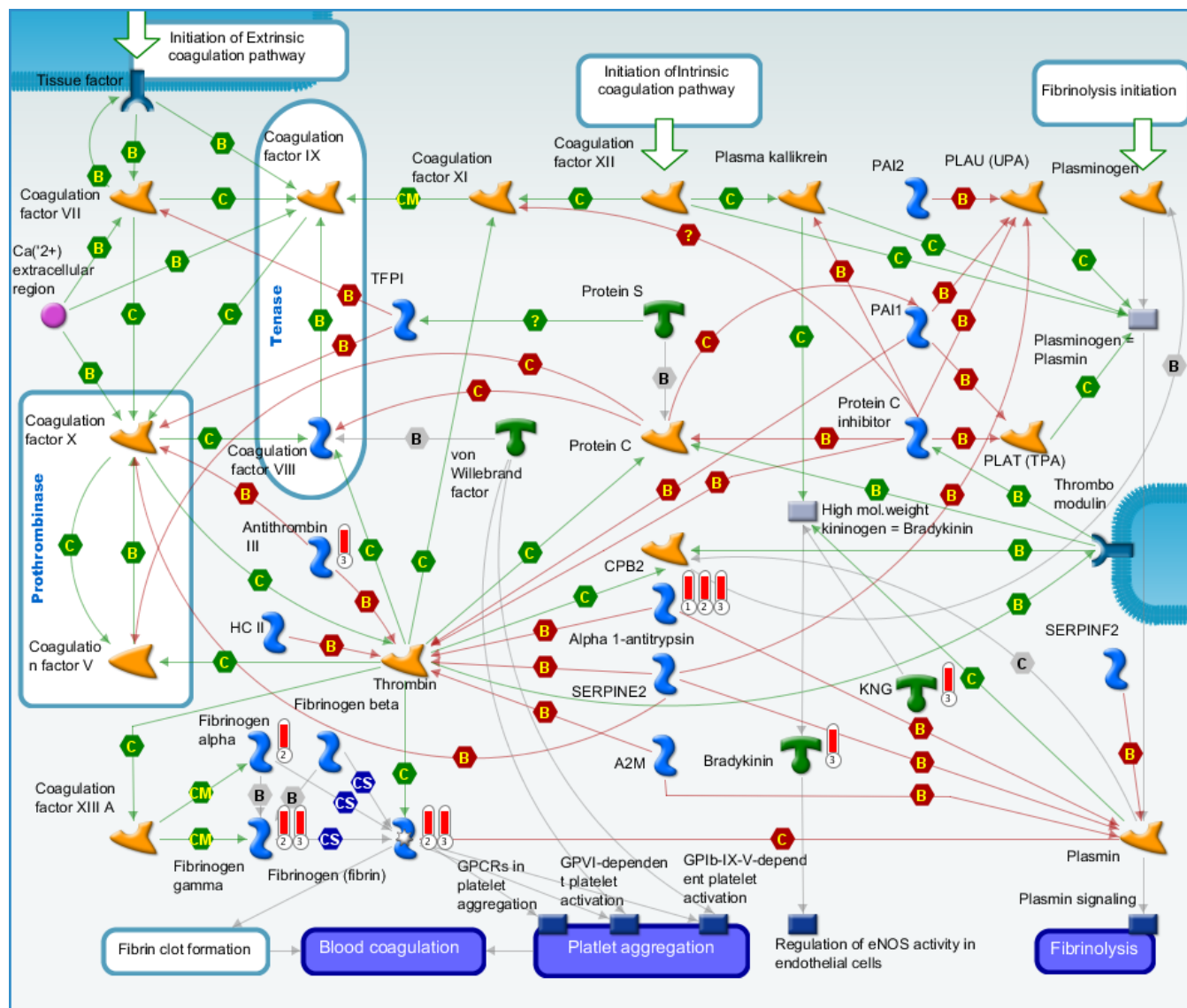


Figura 28: Mapa canônico do mecanismo de coagulação sanguínea representado pelo GeneGo MetaCore™. Os objetos que contém uma barra vertical vermelha adjacente (preenchida: presente) representam proteínas identificadas neste trabalho correspondentes a *spots* pertencentes aos conjuntos união de meningite viral (1), meningite pneumocócica (2) e meningite meningocócica (3). As setas vermelhas indicam inibição, as setas verdes indicam ativação e as setas cinza indicam ação não especificada. A espessura das setas é diretamente proporcional à intensidade da ação ativadora, inibitória ou inespecífica. A legenda detalhada da figura está disponível no apêndice II.

Os resultados da EA associaram o papel do Akt na ativação da transcrição do fator induzido por hipóxia (HIF-1) às meningites, principalmente a meningite meningocócica (valor de p : $3,29 \times 10^{-3}$) (**Figuras 26 e 29**).

A hipóxia, ou deficiência do suprimento de oxigênio no sangue, células ou tecidos, é um importante evento indutor da morte celular. A redução da oferta de oxigênio prejudica o processo de respiração celular diminuindo os níveis de ATP. Este fato afeta processos chaves da homeostase, como o funcionamento das bombas iônicas tais como a de sódio e de potássio ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$). A manutenção de níveis intracelulares elevados de K^+ e baixos de Na^+ é essencial para a integridade dos canais iônicos sensíveis a voltagem. Quando a homeostase é perdida ocorre despolarização da membrana, abertura dos canais iônicos e uma cascata de eventos subsequentes que se não regulados levam à morte celular. Por exemplo, a despolarização da membrana induz a entrada de Ca^{+2} estimulando a liberação de neurotransmissores vesiculares, incluindo o neurotransmissor glutamato. O aumento dos níveis extracelulares de glutamato causa excitação excessiva dos receptores NMDA que, por sua vez, contribui para o dano neuronal mediado pela hipóxia (274).

O HIF é o regulador universal da homeostase do oxigênio. É um fator de transcrição composto pelas subunidades proteicas HIF-1 α e HIF-1 β . Enquanto HIF-1 β é constitutivamente expresso, HIF-1 α é expresso em células hipóxicas. HIF-1 se liga a elementos promotores de mais de 20 genes induzidos por hipóxia resultando na transcrição desses genes que possuem papéis fundamentais na adaptação fisiológica do sistema biológico à hipóxia, por exemplo, pela glicólise, angiogênese e remodelamento vascular. Entre os genes, desta forma, a ativação de HIF-1 aumenta a taxa de transcrição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) durante a hipóxia. A expressão de VEGF é ativada principalmente em astrócitos e neurônios após a hipóxia ou dano celular no cérebro ou medula espinhal (275, 276). Alguns receptores de VEGF são tirosina quinases, como VEGFR-1. A ligação de VEGF aos seus receptores desencadeia eventos de sinalização como a ativação da proteína quinase serina/treonina Akt dependente de quinase fosfatidilinositol (PI3K) (277). A Akt, também chamada proteína quinase B (PKB) favorece a sobrevivência de neurônios mediada por fatores de crescimento que ativam a PI3K, tais como o fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) e o VEGF (278). O mecanismo de ativação da Akt pela PI3K é regulado pela proteína quinase dependente de fosfoinositida (PDK-

1). As subunidades catalíticas de PI3K produzem segundos mensageiros lipídicos fosfatos fosfoinositida (PIP₂ e PIP₃) que agem simultaneamente com PDK-1 que, por sua vez, fosforila e ativa Akt (279).

A Akt desempenha um papel importante na inibição da apoptose neuronal mediada pelo supressor de tumor p53 (**Figura 29**). Este mecanismo de ação não é bem esclarecido, mas sugere-se que a Akt fosforila coativadores que diretamente ou indiretamente modificam a atividade transcrricional de p53, reduzindo a apoptose (280).

A ativação de Akt desencadeia outras vias de sinalização como a fosforilação da quinase glicogênio sintase 3β (GSK-3β) (**Figura 29**). A atividade de GSK-3β pode contribuir para a indução da apoptose e para a modulação da inflamação induzida por patógenos bacterianos.

Durante a hipóxia ocorre tanto a fosforilação de Akt quanto de GSK-3β. A ativação de GSK-3β parece contribuir para a ativação da caspase-3 que apresenta um papel central na execução da apoptose. Por sua vez, a fosforilação de GSK-3β por Akt é controlada por esta última, que causa a inativação de GSK-3β favorecendo a sobrevivência celular (281). Foi demonstrado que o sistema calicreína-cinina (descrito adiante neste trabalho) contribui para a inibição da apoptose em células do miocárdio e da glia através da ativação de Akt (282, 283), resultante da inativação da via de sinalização GSK-3β-caspase-3 (282). Os achados do presente trabalho demonstram uma forte associação deste sistema com a meningite meningocócica (**Figura 26**). Logo, propõe-se uma hipótese de que o sistema calicreína-cinina poderia apresentar um papel protetor contra a apoptose celular nestes pacientes através da ativação de Akt e consequente inativação de GSK-3β-caspase-3. Este fato explicaria, pelo menos em parte, a menor ocorrência de sequelas permanentes graves, como a deficiência neurológica devida à meningite meningocócica em comparação com a meningite pneumocócica (82).

Alguns trabalhos demonstraram a associação da via de sinalização Akt-PI3K com processos inflamatórios, por exemplo regulados pelos receptores *toll*. Martin e colaboradores (284) demonstraram que a inibição de GSK-3β, após o desafio com LPS resultou em um pronunciado aumento mediado por TLR2 da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos, tais como IL-1β, TNF-α, IL-6 e IFN-γ. Portanto, a inibição de GSK-

3 β contribui para a produção de citocinas anti-inflamatórias e permite a regulação da natureza e da severidade da inflamação (284).

Desse modo, propõe-se a hipótese de que a inibição de GSK-3 β pode contribuir para a atenuação dos processos apoptóticos em neurônios e células da glia associados às meningites bacterianas. Além disso, a inativação de GSK-3 β , mediada pela via de sinalização Akt-PI3K, também reduziria o processo inflamatório exacerbado observado na meningite bacteriana através da produção de citocinas anti-inflamatórias por células da defesa imune do hospedeiro. Diversos inibidores de GSK-3 β têm sido avaliados, tais como *Bisindole* (285), *Anilino maleimides* (286), *Kenpaullone* (287) e *Indirubin* (288). Estes fármacos apresentam ação competitiva reversível pelo ATP, o que demonstra um perfil amplo de inibição da GSK-3 β . Além disso, o fármaco *Thiadiazolidinone* (TDZD) também tem sido investigado para a inibição de GSK-3 β no tratamento de pacientes com Alzheimer (289). Esta droga não compete pelo ATP e, sim pelo glicogênio sintase (GS-1).

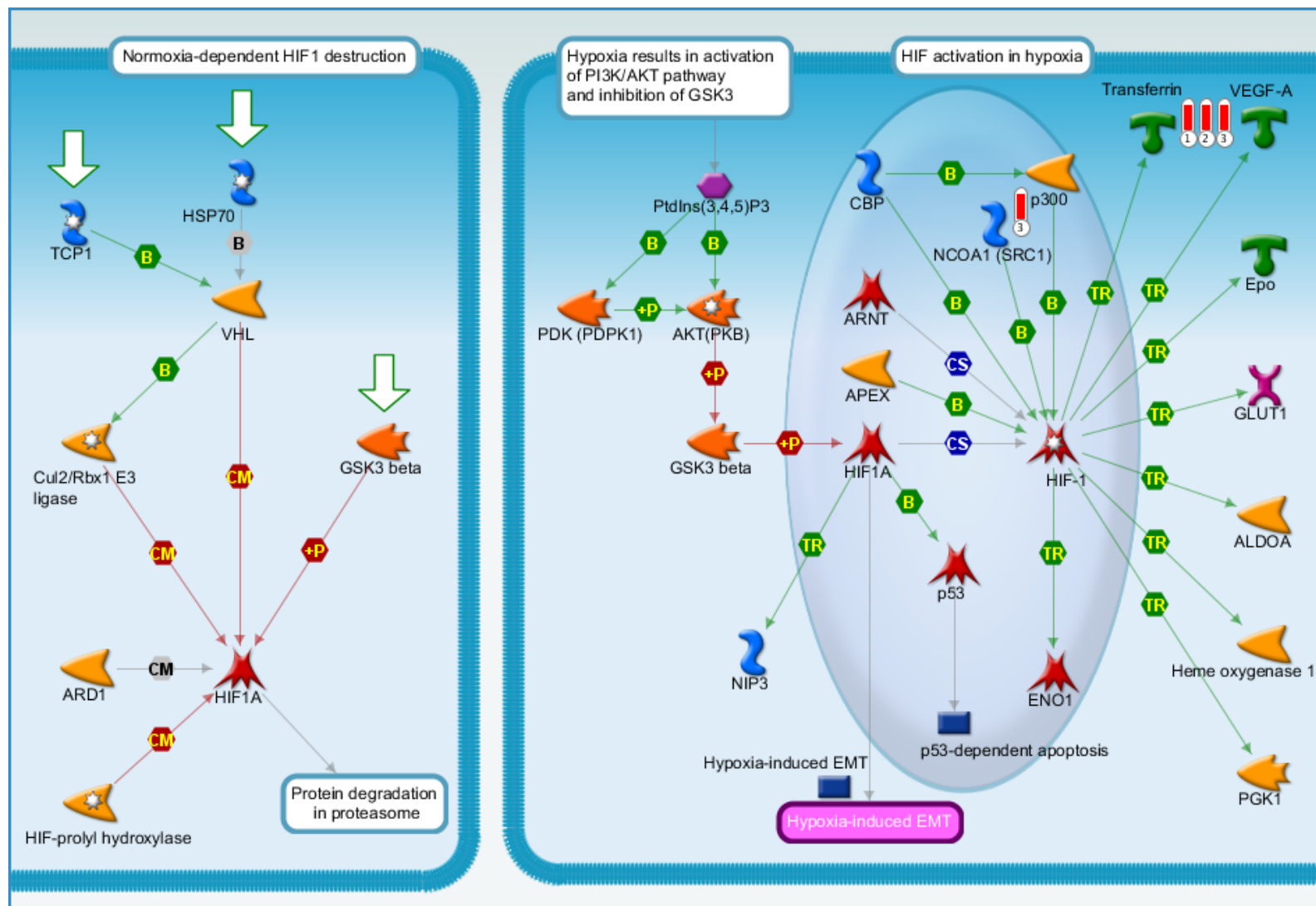


Figura 29: Mapa canônico do papel da transcrição de Akt na ativação de HIF1 induzida por hipóxia representado pelo GeneGo MetaCore™. Os objetos que contém uma barra vertical vermelha adjacente (preenchida: presente) representam proteínas identificadas neste trabalho correspondentes a *spots* pertencentes aos conjuntos união de meningite viral (1), meningite pneumocócica (2) e meningite meningocócica (3). As setas vermelhas indicam inibição; as setas verdes indicam ativação e as setas cinza indicam ação não especificada. A espessura das setas é diretamente proporcional à intensidade da ação ativadora, inibitória ou inespecífica. A legenda detalhada da figura está disponível no apêndice II.

5.5.2 Processos biológicos associados às meningites

Os processos GeneGo são baseadas em informações sobre interações moleculares e processos biológicos anotados e definidos pela equipe de especialistas anotadores e curadores do GeneGo MetaCore™. Nessa etapa da EA, foram encontradas como principais processos GeneGo associados às meningites a inflamação mediada por sinalização de IL-6, principalmente relacionada à meningite pneumocócica (valor de p : $1,07 \times 10^{-13}$), a inflamação mediada pelo sistema caliceína-cinina, e a coagulação sanguínea, ambos mais fortemente associados às meningites meningocócicas (valores de p : $1,7 \times 10^{-7}$ e $1,07 \times 10^{-3}$, respectivamente). Estes dois últimos processos mostram-se fracamente associados às meningites virais (valores de p : $4,53 \times 10^{-1}$ e $2,63 \times 10^{-1}$, respectivamente) (**Figura 30**).

As análises de enriquecimento MetaCore™ revelaram as principais vias de sinalização afetadas por processos patofisiológicos sabidamente associados às meningites que incluem apoptose, resposta ao estresse oxidativo, mecanismos da resposta imune, adesão celular e coagulação sanguínea (16, 17, 290, 291).

A invasão bacteriana no SNC durante a meningite causa ativação dos mecanismos de defesa imune do hospedeiro, como a migração de leucócitos para o local da infecção e a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β e TNF- α . Sabe-se que a atividade exacerbada dos mediadores inflamatórios contribui para alterações dos sistemas de coagulação e fibrinólise que resultam em uma variedade de complicações ao hospedeiro tais como edema cerebral, hidrocefalia e, particularmente as desordens cerebrovasculares (251, 292-295). Estas complicações aumentam a severidade da doença e, pelo menos em parte, contribuem para a alta mortalidade associada à meningite bacteriana (250, 296).

A sepse é caracterizada pela invasão bacteriana na corrente sanguínea evoluindo rapidamente para choque séptico e coagulação intravascular disseminada. Os principais patógenos bacterianos associados às meningites também são importantes causadores de sepse, independente do grupo etário (35, 297-299). Durante a sepse, as células mononucleares estimuladas por citocinas pró-inflamatórias expressam o fator tecidual (TF) que ativa a coagulação induzida pela

inflamação (249, 300). Em modelos experimentais de endotoxemia, foi demonstrado que a expressão *in vivo* de TF é primariamente dependente de IL-6, tendo em vista que a inibição desta interleucina reduziu completamente a produção de TF, enquanto o bloqueio de outras citocinas praticamente não alterou sua expressão (301).

Na meningite, a IL-6 contribui diretamente para o aumento da permeabilidade da BHE causando elevação da pressão intracraniana e edema cerebral (302, 303). O mecanismo provável para este efeito pode estar relacionado à diminuição da resistência elétrica transendotelial e à indução de modificações morfológicas nas células endoteliais resultando no aumento da permeabilidade da BHE (304, 305). Em modelo experimental de meningite pneumocócica, foi relatado que a infusão sistêmica de IL-6 induziu o rompimento da BHE causando edema cerebral (302). O nível de IL-6 está alterado precocemente na meningite, tendo sido observada elevação desta interleucina após seis horas de infecção em modelo experimental de meningite pneumocócica (306). Da mesma forma, as concentrações de IL-6 no líquido de pacientes com meningite bacteriana (49,017pg/mL) são 40 vezes superiores às encontradas na meningite viral (1,076pg/mL) (307). A concentração aumentada de IL-6 na meningite bacteriana contribui para as complicações cerebrovasculares que resultam em sequelas permanentes, mais frequentes nos pacientes com meningite pneumocócica (**Figura 30**). Neste contexto, propomos a hipótese de que a inibição da IL-6 poderia atenuar os processos coagulatórios decorrentes da meningite bacteriana, reduzindo a severidade da doença. Para isso, sugere-se o reposicionamento farmacológico do *Siltuximab*, que se apresenta na fase clínica II para a terapia de mielomas múltiplos, carcinomas dentre outros tipos de câncer (308-310). O *Siltuximab* é um anticorpo monoclonal anti-IL-6 que inibe pela ligação específica e neutralização da IL-6 humana com alta afinidade. Até o presente, não existem trabalhos que avaliem o papel do *Siltuximab* para o tratamento de doenças no SNC, portanto, ainda não há dados sobre a transposição desta droga na BHE.

Os resultados do presente trabalho indicam a associação entre a proteína cininogênio e a meningite causada por *N. meningitidis*. Esta proteína é um constituinte do sistema calicreína-cinina [*kallikrein-kinin system* (KKS)]. Este sistema também foi associado com a meningite meningocócica na análise de enriquecimento feita, neste estudo, com o *software* GeneGo MetaCore™ (**Figura 30**). No entanto,

não foram encontrados outros trabalhos na literatura científica que relacionem o sistema KKS, ou a proteína cininogênio às meningites, apesar de ambos já terem sido associados a diferentes patologias no SNC, tais como a doença de Alzheimer (248, 311), a esquizofrenia (312) e o lúpus neuropsiquiátrico (313).

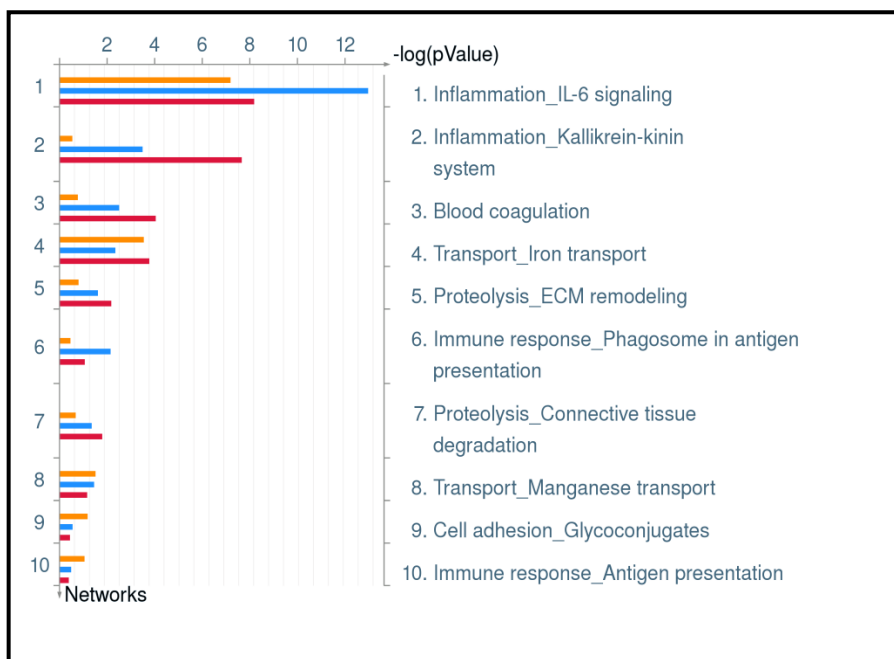


Figura 30: Distribuição de processos celulares GeneGo, representado pelo MetaCore™. Listas das proteínas identificadas a partir do conjunto de *spots* que compõem a união foram usadas como arquivos de entrada. Barra laranja: proteínas do líquido de pacientes com meningite viral; barra azul: proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica; Barra vermelha: proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica.

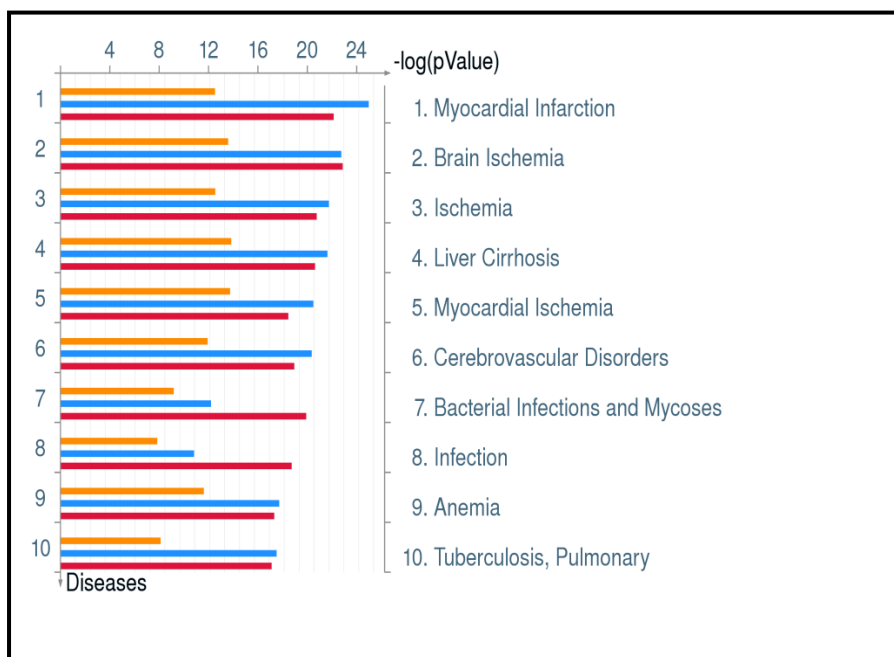


Figura 31: Distribuição de doenças associadas à biomarcadores, representado pelo MetaCore™. Listas das proteínas identificadas a partir do conjunto de spots que compõem a união foram usadas como arquivos de entrada. Barra laranja: proteínas do líquido de pacientes com meningite viral; barra azul: proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica; Barra vermelha: proteínas do líquido de pacientes com meningite meningocócica.

O sistema caliceína-cinina (KKS), também chamado de sistema de contato, ou via intrínseca da coagulação compreende quatro proteínas, sendo três proteinases, fator XII, fator XI e a caliceína, além de um cofator não enzimático de alto peso molecular (110kDa), o cininogênio (314) (**Figura 30**). O cininogênio de alto peso molecular está presente na circulação sanguínea complexado ao fator XI ou à caliceína plasmática (315). O sistema KKS é ativado quando estes complexos e o fator XII estimulam a clivagem do cininogênio pela enzima caliceína para a liberação do peptídeo pró-inflamatório bradicinina (315). Concomitantemente, o fator XI é ativado e a cascata intrínseca de coagulação é iniciada levando, eventualmente, à formação da rede de fibrina (315, 316). Nas doenças infecciosas severas ou invasivas, o desequilíbrio entre o estado anticoagulante e o pró-coagulante ativa as cascatas proteolíticas do hospedeiro, por exemplo, as cascatas do complemento e da coagulação, bem como do sistema de contato (315-317).

Há duas formas de cininogênio, o de alto peso molecular (HK) e o de baixo peso molecular (LK). As duas formas derivam de um pré-cininogênio codificado por um único gene, dependendo da clivagem do precursor (318). Enquanto HK tem um papel central no sistema KKS, o LK não é clivado quando este sistema é ativado, por isso não participa deste processo (315).

Como anteriormente mencionado, o cininogênio é uma proteína precursora de cinina que, por sua vez, se liga a dois tipos de receptores, B1 e B2. Enquanto o receptor B2 é expresso em diversos tipos celulares, inclusive em células endoteliais, o receptor B1 é escasso até que haja estimulação por agentes pró-inflamatórios, como IL-1 β , em condições patofisiológicas (314, 319, 320). Contudo, alguns tecidos e células expressam constitutivamente o receptor B1, como a medula espinhal, o córtex e o hipocampo (321-324). Ambos receptores são membros da subfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (325) que, ao se ligarem às famílias G α_q e G α_i , causam o aumento de cálcio intracelular (Ca⁺²) que, por sua vez, regula diversos processos vasculares, incluindo a produção de NO (319, 320). Esta espécie reativa participa de inúmeros processos regulatórios em diferentes órgãos e tecidos, por exemplo, na proteção contra patógenos bacterianos pelo sistema imune (325). As células endoteliais são fontes primárias de NO que, em condições normais, é produzido pela enzima eNOS. A atividade de eNOS é mediada pela ativação do receptor B2 do cininogênio pelo aumento do Ca⁺² intracelular, entre outros mecanismos. A produção de NO via eNOS-mediada por B2 permite a regulação da pressão sanguínea e mantém o funcionamento normal da barreira endotelial (326, 327). Por outro lado, em condições inflamatórias, as células endoteliais podem expressar a enzima iNOS para a produção de NO sob estimulação de mediadores inflamatórios como LPS, ou citocinas como IL-6, IL-1 β e IFN- γ . Embora pouco estudada, sabe-se que a produção de NO por iNOS é mediada pelo receptor B1 em um processo independente de Ca⁺² intracelular. A ativação de iNOS pelo receptor B1 está associada à via de sinalização extracelular regulada por quinase (ERK) (328). A fosforilação dependente da ERK de iNOS na Ser⁷⁴⁵ é responsável pela liberação de altas concentrações de NO pela iNOS (329). A produção de NO via eNOS-mediada por B2 e por iNOS-mediada por B1 são notavelmente distintas. Enquanto a ativação do receptor B2 resulta na liberação de baixos níveis de NO (~165nM) durante aproximadamente 5 minutos, o mecanismo associado ao receptor B1 estabelece uma resposta mais intensa e prolongada liberando altas concentrações de NO (~800nM) por pelo menos 90 minutos (325). A produção de NO por iNOS parece estar associada primariamente a funções citotóxicas (330) (**Figura 32**). Alguns trabalhos utilizando modelos animais *knockout* para o receptor B1 têm revelado o papel deste receptor no agravamento de condições inflamatórias, como a sepse (320, 331, 332). Por exemplo, Pesquero e colaboradores (321) demonstraram que

camundongos *knockout* para B1 (B1R^{-/-}) são saudáveis, normotensos e estão protegidos do choque séptico devido à infusão intravenosa de LPS de gram-negativos (ex: meningococos) (321, 332). Ao mesmo tempo, a expressão do receptor B1 em ratos transgênicos aumentou a letalidade em resposta ao desafio por LPS (333).

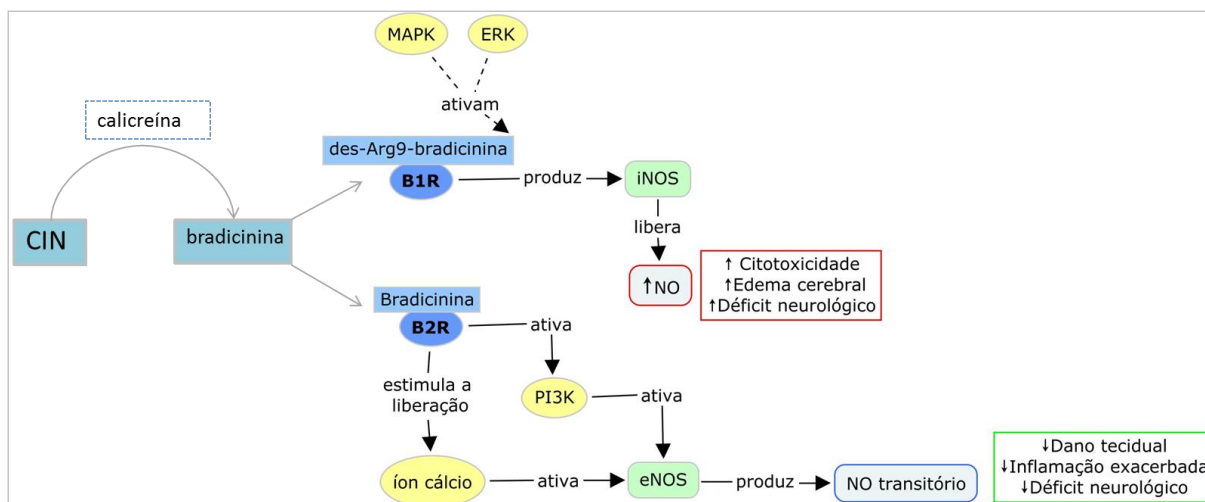


Figura 32: Receptores de cinina B1 e B2 e a produção de NO mediada por nNOS. A bradicinina é gerada da quebra do cininogênio (CIN) pela enzima caliceína. A ligação da bradicinina ao receptor B2R, acoplado às famílias Gαq e Gαi, ativa a quinase fosfatidilinositol (PI3K) e provoca a liberação de Ca⁺² intracelular. Ambos os processos ativam a óxido nítrico sintase endotelial para a produção de NO transitório que previne o dano tecidual e atenua a inflamação exacerbada e o déficit neurológico. A carboxipeptidase M remove uma arginina (Arg) C-terminal da bradicinina que, então interage com o receptor B1R. Em condições inflamatórias, a estimulação de B1R resulta em uma alta e prolongada produção de óxido nítrico (NO) pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS) dependente da ativação das vias quinases de sinalização extracelular (ERK) e ativadora de mitógeno (MAP). Esta produção exacerbada de NO resulta em efeitos citotóxicos, formação de edema cerebral e déficit neurológico. (Cordeiro AP).

Em estados patológicos, a ativação do sistema de contato por patógenos bacterianos permite o influxo do plasma para o sítio de infecção que, subsequentemente, auxilia na disseminação da infecção, via microcirculação (334-336). Quando a ativação do sistema de contato na circulação é exacerbada, o aumento de cinina e o consumo de outros fatores desse sistema podem contribuir para a evolução da coagulopatia e da hipotensão hipovolêmica, como em casos de sepse e choque séptico (315). Estas infecções generalizadas estão mais frequentemente associadas à meningite meningocócica (297, 337, 338), o que está de acordo com o presente estudo que relaciona a proteína cininogênio à meningite por *N. meningitidis*, mas não à meningite pneumocócica. A bactéria *N. meningitidis*

pode causar tanto septicemia quanto meningite. Hemorragias na pele (*purpura fulminans*) e a multiplicação bacteriana nos órgãos do hospedeiro são as características básicas da septicemia. Ainda que o meningococo atravessasse a BHE durante a sepse, não haverá tempo hábil para que a inflamação aconteça antes que o paciente evolua para óbito. Por outro lado, na meningite o patógeno atravessa a BHE e desencadeia o processo inflamatório no espaço subaracnoide (35).

Todos os componentes do sistema de contato têm sido descritos nos cérebros de humanos e ratos (247, 320, 339, 340). Da mesma forma, os receptores de cinina são expressos em diversos tecidos cerebrais, como hipocampo, córtex, medula espinhal e astrócitos tanto em condições normais, quanto patológicas (341-346). O papel dos receptores de cinina tem sido investigado em diversas doenças do SNC, como Alzheimer e esclerose múltipla (248, 347). Martins e colaboradores (348) demonstraram que o receptor de cinina B2 apresenta efeitos protetores no SNC, enquanto o receptor B1 possui efeitos tóxicos nesse sistema. A estimulação do receptor B2 preservou a integridade dos neurônios piramidais do hipocampo contra a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA provocada pelo aumento excessivo das concentrações extracelulares de glutamato. A proteção pelo receptor B2 contra a morte celular mediada por NMDA parece ocorrer pela ativação da quinase fosfatidilinositol (PI3K). A inibição de PI3K reverte o estado protetor alcançado através da estimulação do receptor B2 e permite a morte neuronal mediada por excitação excessiva dos receptores NMDA (348). Além disso, foi demonstrado que a ativação do receptor B2 protege contra o dano cerebral e a deficiência neurológica atenuando a apoptose e a inflamação induzidas por acidente vascular isquêmico (349). Além de proteger contra o dano cerebral, a injeção intravenosa da enzima calicreína promove a angiogênese e a neurogênese após a isquemia cerebral (350). A ativação da calicreína em modelo experimental de ratos adultos com isquemia cerebral resultou em aumento considerável dos níveis de NO ao mesmo tempo em que a atividade da NADPH oxidase e a produção de superóxido foram reduzidas. A produção de NO em cérebro isquêmico inibe a geração de ROS, o que protege contra apoptose induzida por isquemia (283). Enquanto o bloqueio do receptor B2 resultou em dano cerebral exacerbado em modelo animal de isquemia cerebral, a inativação do receptor B1 favoreceu a proteção contra o infarto e o edema cerebral em camundongos pós-isquêmicos (351). A inibição do receptor B1 também se relaciona à diminuição da migração

transendotelial de leucócitos através da BHE e à proteção da integridade dessa barreira em processos autoimunes como a esclerose múltipla (347). Desse modo, o bloqueio do receptor B1, mas não de B2, parece contribuir para a redução do dano tecidual cerebral, da inflamação local exacerbada, do déficit neurológico e da mortalidade associados à isquemia, etc. Assim, o papel protetor do sistema de contato parece estar preferencialmente associado ao receptor B2 que permite a regulação da pressão sanguínea, reduz a permeabilidade da BHE e diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias (319, 351, 352).

A isquemia cerebral, as desordens cerebrovasculares e as infecções bacterianas são doenças que foram associadas às proteínas identificadas no presente trabalho por meio da análise feita com o MetaCore. Estas doenças foram mais fortemente associadas às meningites bacterianas (**Figura 31**).

A meningite é uma doença inflamatória aguda das meninges intimamente relacionada à evolução de complicações cerebrovasculares, como aumento da pressão intracraniana, edema cerebral e morte celular que favorecem o mau prognóstico da doença e a ocorrência de sequelas permanentes. Entretanto, a incidência de sequelas neurológicas durante a meningite varia de acordo com o agente etiológico causador da doença, sendo mais associada à meningite pneumocócica (79). A porcentagem de casos que evoluem para sequelas neurológicas, dentre os sobreviventes, varia de 16 a 38% na meningite pneumocócica e de 3 a 21% na meningite meningocócica (82, 169, 353). Uma explicação para a menor incidência de sequelas neurológicas na meningite meningocócica poderia ser a ativação do sistema de contato que teria uma ação neuroprotetora no cérebro com atenuação de diversas complicações cerebrovasculares, tais como o aumento da permeabilidade vascular e a formação de edema cerebral (319). Alinhado a esta hipótese, neste trabalho a proteína cininogênio ocorreu somente no subconjunto interseção do grupo de pacientes com meningite meningocócica. Desse modo, propõe-se a hipótese de que a ativação do sistema de contato pode contribuir para a redução de sequelas neurológicas observadas na meningite meningocócica. Se, por um lado a ativação do receptor B1 é decorrente da condição inflamatória já instalada (352), por outro lado, a ativação do receptor B2 resultaria na proteção contra a meningite pelo sistema de contato. A ausência de cininogênio no líquido de pacientes com meningite pneumocócica estaria de acordo com o fato de que complicações cerebrovasculares ocorrem mais

frequentemente nesses pacientes, o que contribui para a maior ocorrência de sequelas neurológicas permanentes. Portanto, propomos a hipótese de que um potencial ativador da via do cininogênio pela estimulação do receptor B2 favoreceria a produção de NO por eNOS contribuindo para a redução das complicações cerebrovasculares graves na meningite associadas a altas taxas de morbidade. Entretanto, o único fármaco ativador do receptor B2, *Labradimil*, usado para o tratamento de neoplasma cerebral foi descontinuado. Uma alternativa recente seria a investigação do agonista do receptor B2, NG291 (354), que ainda está sendo avaliado somente para o tratamento de doenças cardiovasculares. Por isso, não há dados que demonstrem se este fármaco apresenta capacidade de transpor a BHE.

O bloqueio seletivo do receptor B1 também pode ser sugerido para o tratamento das meningites bacterianas, visando à prevenção do edema cerebral, o déficit neurológico e a excitotoxicidade. O antagonista do receptor B1, SSR240612, tem eficiente penetração no SNC e age como um seletivo bloqueador da ligação do receptor B1 a des-Arg9-bradicinina (355). Em modelo experimental de Alzheimer, a utilização do fármaco SSR240612 interrompeu o processo de amiloidose, o déficit de aprendizado e cerebrovascular (356). Diante disso, propomos a hipótese de utilização de um bloqueador seletivo do receptor B1 como estratégia terapêutica para as meningites bacterianas.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a análise proteômica comparativa de proteínas do líquido de pacientes com meningite pneumocócica, meningocócica, viral e indivíduos sem infecção no SNC permitiu a construção de um modelo preditivo qualitativo para o diagnóstico diferencial dessas formas da doença que poderá contribuir para a tomada de decisão pela abordagem terapêutica adequada e em tempo hábil para cada forma de meningite.

Este trabalho é o primeiro a propor a proteína cininogênio como marcador biológico no líquido para meningite meningocócica. Os processos associados à proteína cininogênio estão diretamente relacionados à patofisiologia da meningite bacteriana, sobretudo por *N. meningitidis*, que frequentemente inclui um quadro severo de septicemia. O papel da proteína cininogênio tem sido alvo de investigação por outros grupos de pesquisa em septicemia e choque séptico.

As análises complementares de bioinformática para previsão de localização celular das proteínas correspondentes aos *spots* que compõem os subconjuntos interseção das meningites revelaram tratar-se de proteínas majoritariamente extracelulares e, portanto, possivelmente ativas na resposta imune do hospedeiro no sítio de infecção. As análises de interatoma feitas a partir das análises de enriquecimento utilizando-se o *software* MetaCore™ contribuíram para um melhor entendimento dos mecanismos patofisiológicos inerentes às meningites. Estes resultados foram essenciais para a proposição de possíveis alvos terapêuticos para a modulação da resposta inflamatória à meningite bacteriana visando prevenir as sequelas e óbitos frequentemente causados por esta doença.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectiva do presente trabalho, pretende-se a validação do modelo preditivo qualitativo por ensaios imuno-enzimáticos (ELISA) em um painel amplo de amostras de líquido de indivíduos controles e pacientes com meningite pneumocócica, meningocócica e viral. Posteriormente, é objetivo do grupo o desenvolvimento de um teste rápido para o diagnóstico diferencial “point of care” das meningites a partir de amostras de líquido. O modelo preditivo qualitativo para o diagnóstico diferencial das meningites, apresentado neste trabalho, está sendo analisado quanto a sua viabilidade patentária pelos órgãos competentes. Recentemente, foi recebido o parecer positivo da Coordenação da Gestão Tecnológica (GESTEC) da FIOCRUZ em resposta ao pedido de patente, disponível na seção de anexos do presente trabalho.



Parecer 03/13 – ÁREA DE PATENTES/GESTEC/VPPIS

DEMANDA

Estudo de viabilidade patentária a partir de dados fornecidos na SG196/12, através da notificação de invenção intitulada: “Kit para diagnóstico diferencial das meningites pneumocócica, meningocócica e viral baseado na detecção de proteínas da resposta inflamatória do hospedeiro humano presentes no líquido cefalorraquidiano.”.

INTRODUÇÃO

O Estudo de Viabilidade Patentária tem como função verificar a patenteabilidade dos dados apresentados pelos pesquisadores, segundo os critérios constantes na Lei de Propriedade Industrial – LPI, quais sejam, novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

Para tal, faz-se necessária a busca do estado da arte, conforme as informações prestadas, a solução técnica proposta pela pesquisa e o possível produto ou processo a ser patenteado.

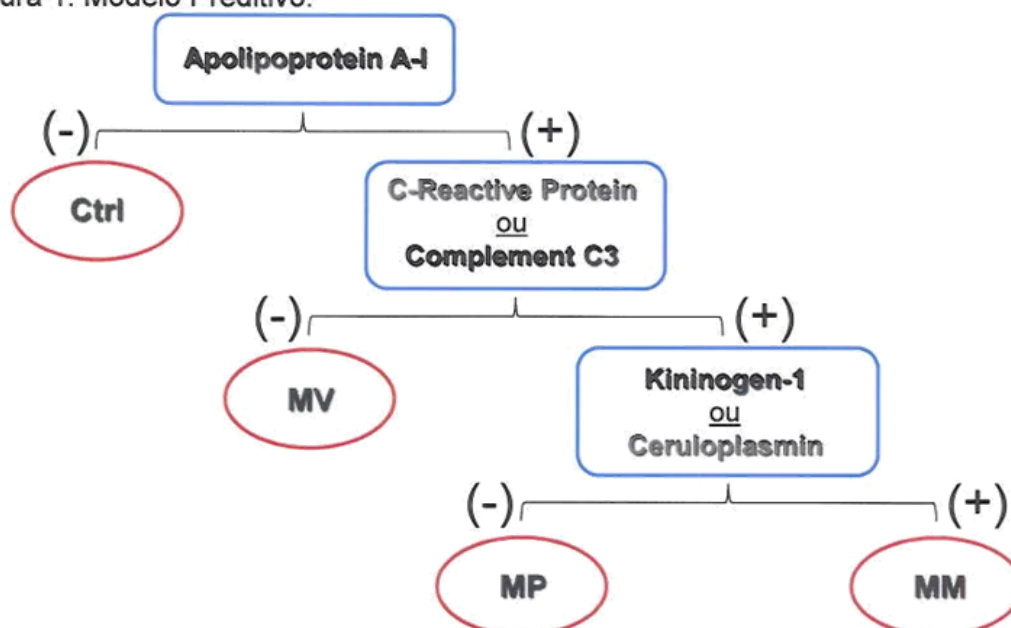
As informações prestadas pelos pesquisadores apresentam um modelo preditivo capaz de diferenciar pacientes com meningites pneumocócica, meningocócica ou viral de indivíduos sem infecção no sistema nervoso central. Esse modelo foi construído através da identificação de proteínas da resposta inflamatória do hospedeiro humano presentes no líquido cefalorraquidiano (ou líquido ou fluido cefalorraquidiano) que funcionam como biomarcadores.

O diagnóstico preciso e rápido das meningites é fundamental para a tomada de decisão pela abordagem terapêutica adequada e em tempo hábil para cada forma de meningite. Atrasos na administração de antibióticos e anti-inflamatórios podem ter consequências devastadoras para o paciente com meningite bacteriana, principalmente, (sequelas neurológicas permanentes até a morte). O diagnóstico diferencial rápido pode reduzir o tempo de hospitalização, os custos do tratamento, a exposição dos pacientes ao risco de infecções nosocomiais e os efeitos indesejáveis do uso de antibióticos.

As proteínas biomarcadoras foram selecionadas através de eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D PAGE) e identificadas por espectrometria de massas. Apolipoproteína A-I, proteína C-reativa, complemento C3, cininogênio-1 e ceruloplasmina foram às proteínas elencadas como potencial biomarcadores para o diagnóstico diferencial das meningites. Combinadas em um modelo preditivo, apresentado na figura 1, essas proteínas específicas foram capazes de distinguir entre os pacientes com meningites pneumocócica, meningocócica e viral dos indivíduos sem infecção no sistema nervoso central.

De acordo com os pesquisadores, a sensibilidade, especificidade e acurácia foram de 100% no estudo envolvendo 24 pacientes (seis em cada grupo), testados em duplicata técnica.

Figura 1: Modelo Preditivo.

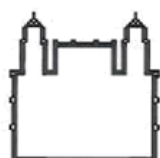


A busca foi realizada nas bases de dados: Scifinder, Scopus e Pubmed. E na ferramenta de busca de patentes Orbit®. Além disso foram consideradas as referências citadas na Notificação de Invenção e no Parecer de Patenteabilidade elaborado pelo NIT-CPqRR.

RESULTADO DA BUSCA

No processo de busca de anterioridades, os documentos abaixo relacionados foram selecionados por sua relevância frente ao projeto de pesquisa em questão:

Documentos de Anterioridade	Data	Categoria *
D1: Song H, Seishima M, Saito K, Maeda S, Takemura M, Noma A, Kondo A, Manabe M, Urakami K, Nakashima K: Apo A-I and apo E concentrations in cerebrospinal fluids of patients with acute meningitis. <i>Ann Clin Biochem</i> 1998, 35 (Pt 3):408-414.	1998	X
D2: Paradowski M, Lobos M, Kuydowicz J, Krakowiak M, Kubasiewicz-Ujma B: Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in the course of bacterial meningitis. <i>Clin Biochem</i> 1995, 28(4):459-466.	1995	X
D3: Goonetilleke UR, Scarborough M, Ward SA, Hussain S, Kadioglu A, Gordon SB: Death is associated with complement C3 depletion in cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis. <i>MBio</i> 2012, 3(2).	2012	X
D4: Stahel PF, Nadal D, Pfister HW, Paradisis PM, Barnum SR: Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. <i>The Lancet</i> 1997, 349: 1886-1887.	1997	X
D5: UAB Research Foundation. Scott R Barnum, Philip Stahel. Method of discriminating bacterial from aseptic meningitis. US n. 5,778,895, 29 jan. 1997, 14 jul. 1998.	1997	X



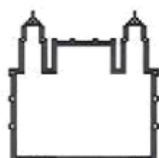
D6: Oehmcke S, Herwald H: Contact system activation in severe infectious diseases. J Mol Med 2010, 88:121–126.	2010	Y
D7: Łobos, M., Rusinek, A., Paradowski, M., Kuydowicz, J., Stanisławska-Majda, E., Mamełka, B., Szablewski, M., Piatas, S.: Does the estimation of acute phase protein concentrations in cerebrospinal fluid and/or in serum in patient with viral meningitis carry diagnostic importance? Part I. Lymphocytic meningitis caused by parotitis epidemica. Przegląd epidemiologiczny 2002, 56(4): 615-622.	2002	Y
* Categorias dos Documentos		
"X"	Documento de particular relevância em relação à novidade.	
"Y"	Documento de particular relevância em relação à atividade inventiva.	
"O"	Documento referente a uma revelação oral, uso, exibição, ou outros meios que não o documento impresso.	
"A"	Documento que define o estado da técnica, em geral, não sendo considerado de particular relevância.	
"P"	Documento publicado entre a data de prioridade e a data de depósito do pedido nacional ou internacional (PCT).	
"&"	Documento pertencente à mesma família de patentes.	

Seguem abaixo os comentários acerca dos referidos documentos:

D1: Nesse estudo, a apolipoproteína A-I (apo A-I) foi quantitativamente analisada no líquido cérebro-espinhal (ou cefalorraquidiano) de pacientes com ou sem doença neurológica. A concentração de apo A-I no líquido cérebro-espinhal de doentes com meningite mostrou-se aumentada na fase aguda da doença, retornando a concentrações basais na fase convalescente enquanto o nível de apo A-I no líquido cérebro-espinhal de pacientes com outras doenças neurológicas permaneceu inalterado em relação ao grupo de pacientes controle. Esses achados sugerem que a presença de apo A-I no líquido cérebro-espinhal de pacientes com meningite aguda sirva de possível marcador para essa doença.

D2: O artigo determina a concentração das proteínas de fase aguda presentes no soro e no líquido cérebro-espinhal (ou cefalorraquidiano) de pacientes portadores de meningite bacteriana ou viral e avalia o uso de algumas dessas proteínas no diagnóstico diferencial desses tipos de meningites. A proteína C-reativa e a α -2-ceruloplasmina são proteínas identificadas como potencial marcador no diagnóstico diferencial da meningite. Além disso, o artigo cita diversas outras referências que relatam o uso da proteína C-reativa como marcador para diferenciar as meningites bacteriana e viral.

D3: O artigo demonstra que a proteína complemento C3 não está presente no líquido cérebro-espinhal (ou cefalorraquidiano) dos indivíduos do grupo controle, ou seja, aqueles não portadores de meningite pneumocócica (meningite bacteriana). Já no grupo de pacientes portadores de meningite bacteriana que evoluíram para óbito, os níveis de complemento C3 foram cinco vezes menores que no grupo sobrevivente (grupo de pacientes portadores de meningite bacteriana que não evoluíram para óbito). Esse mesmo comportamento não foi observado no soro dos mesmos pacientes, indicando uma resposta compartimentalizada no líquor durante a meningite bacteriana. Os autores concluíram que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e a depleção nos níveis do complemento C3 podem ter papel determinante em casos de meningite bacteriana.



D4: Nesse estudo foi medida a concentração de dois componentes do sistema complemento, C3 e fator B, em amostras do líquido cérebro-espinhal (ou cefalorraquidiano) de 18 pacientes diagnosticados com meningite bacteriana, 21 pacientes diagnosticados com meningite asséptica e de 64 pacientes controles sem infecção no sistema nervoso central. A concentração média do complemento C3 no líquido cefalorraquidiano dos pacientes com meningite bacteriana foi significativamente maior que naqueles com meningite asséptica e nos indivíduos controle. Diante dos resultados os autores concluem que a concentração do complemento C3 no líquido cérebro-espinhal pode ter relevância clínica no diagnóstico diferencial das meningites bacteriana e asséptica com alta sensibilidade (100%) e especificidade (95,2%).

D5: Documento de patente baseado no artigo D4.

D6: O trabalho apresenta um panorama do estado da arte referente à ativação do sistema de contato em casos de infecção severa, além de discutir um possível papel desse sistema como alvo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Dentre o panorama apresentado, são citadas referências que demonstram a ativação pronunciada do sistema de contato em crianças com choque séptico meningocócico e em pacientes com síndrome do choque tóxico estreptocócico.

D7: O trabalho avalia o aumento na concentração de proteínas de fase aguda no líquido cefalorraquidiano e/ou plasma de crianças com meningite linfocitária resultante da complicação da caxumba (*parotitis epidêmica from the Paramyxoviridae family*). Também foi testado a utilidade da determinação dessas proteínas no diagnóstico e monitoramento do curso da doença. As proteínas avaliadas foram: *C-reactive protein (CRP)*, *alpha-2-haptoglobin (HPT)*, *alpha-1-antitripsin (AAT)* e *alpha-1-acid glycoprotein (AAG)*, *alpha-2-ceruloplasmin (CER)* and *alpha-2-macroglobin (AMG)*. Os resultados da pesquisa mostram um aumento significativo em todas as proteínas de fase aguda avaliadas, exceto para *CRP* e *AAG*, em crianças com meningite parotidária. Apenas a determinação da concentração de *CRP*, tanto no líquido quanto no soro, não é útil no diagnóstico de meningite parotidária e na diferenciação das formas linfocitárias e bacterianas da doença.

CONCLUSÃO

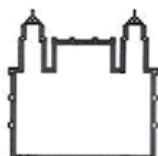
Os documentos **D1** a **D7** caracterizam o estado da técnica referente à invenção apresentada e serviram de base para as conclusões preliminares a seguir.

Considerando as etapas do modelo preditivo, tem-se que a apolipoproteína A-I está descrita no documento **D1** como marcador para diagnóstico de meningite, tornando essa etapa do modelo conhecida e, portanto sem novidade.

O documento **D2** apresenta a proteína C-reativa como marcador no diagnóstico diferencial das meningites bacteriana e viral, assim como previsto no modelo, antecipando a matéria e com isso retirando sua novidade.

Com relação a utilização do complemento C3 como marcador diferencial das meningites bacterianas e viral, os documentos de **D3** a **D5** descrevem essa utilização o que comprova a ausência de novidade dessa etapa.

A correlação apresentada na última etapa do modelo, onde as proteínas cininogênio-1 e/ou ceruloplasmina são utilizadas como marcadores para diferenciação entre meningite pneumocócica e meningocócica, não foi encontrada no estado da arte. Ainda assim cabem as seguintes perguntas:



- I. De acordo com as informações apresentadas no documento anexo à Notificação de Invenção intitulado "Descrição da Solução Proposta pela Invenção" – página 15, linhas 7 a 18 – associadas ao documento D6 que traz uma visão geral do estado da arte referente à ativação do sistema de contato em casos de infecção severa, por que não esperar o papel do cininogênio como marcador nessa etapa do modelo?
- II. Considerando os documentos D2 e D7 que correlacionam a alteração dos níveis de ceruloplasmina no líquido de pacientes com meningite bacteriana e meningite linfocitária, respectivamente, por que não esperar que essa proteína tenha papel como biomarcador na diferenciação proposta no modelo?

Uma última questão que deve ser antecipada, já que pode ser questionada caso a invenção seja levada à Comissão de Propriedade Intelectual da Fiocruz (COPAT) é:

- III. Considerando as perspectivas apresentadas no documento anexo à Notificação de Invenção intitulado "Descrição da Solução Proposta pela Invenção" – página 15 – é possível que a invenção seja utilizada em plataformas diagnósticas automatizadas?

Face aos argumentos expostos, consideramos que as etapas 1 e 2 do modelo preditivo apresentado não constituem matéria passível de proteção patentária pela carência de novidade e atividade inventiva frente ao conhecimento apresentado pelos documentos D1 a D5. A etapa 3 parece ter novidade, porém a atividade inventiva pode vir a ser questionada dependendo da resposta às perguntas I e II. Assim, sugerimos uma reunião para maiores esclarecimentos a ser agendada com os pesquisadores e representantes do NIT-CPqRR.

Vale ressaltar que a novidade e a atividade inventiva são pressupostos legais para a concessão de patente (art. 11 e 13, da Lei nº 9279/96, Lei de Propriedade Industrial) e tem por definição legal o abaixo transcrito:

Art. 11 A invenção e o modelo de utilidade são considerados novos quando não compreendidos no estado da técnica.

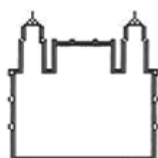
§ 1º O estado da técnica é constituído por tudo aquilo tomado acessível ao público antes da data de depósito do pedido de patente, por descrição escrita ou oral, por uso ou qualquer outro meio, no Brasil ou no exterior, ressalvado o disposto nos arts. 12, 16 e 17.

Art. 13. A invenção é dotada de atividade inventiva sempre que, para um técnico no assunto, não decorra de maneira evidente ou óbvia do estado da técnica.

Este é o parecer, salvo melhor entendimento.

Rio de Janeiro, 14 de maio de 2013.

Érica Riskalla Anchite Vieira, MSc
Analista de Gestão em Saúde
Mat. SIAPE: 1957155
Área de Patentes
Coordenação de Gestão Tecnológica
Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde
Presidência/FIOCRUZ



Parecer 03-A/13 – ÁREA DE PATENTES/GESTEC/VPPIS

DEMANDA

Reavaliação do Parecer 03/13 – estudo de viabilidade patentária a partir de dados fornecidos na SG196/12, através da notificação de invenção intitulada: “Kit para diagnóstico diferencial das meningites pneumocócica, meningocócica e viral baseado na detecção de proteínas da resposta inflamatória do hospedeiro humano presentes no líquido cefalorraquidiano.” – após esclarecimentos prestados em reunião com os pesquisadores Roney Santos Coimbra e Ana Paula Cordeiro e com a representante do NIT-IRR Cristina Lima Carrara.

INTRODUÇÃO

Em resposta aos questionamentos contidos no Parecer 03/13, os seguintes pontos foram esclarecidos pelo pesquisador Roney em reunião realizada no dia 20 de maio de 2013 via Skype® com a presença dos pesquisadores Roney Santos Coimbra e Ana Paula Cordeiro, da representante do NIT-IRR Cristina Lima Carrara, da gerente da área de patentes da GESTEC Adriana C. M. Britto e da analista de patentes da GESTEC Érica R. A. Vieira.

A. Quanto ao questionamento “I” do parecer, abaixo transcrito:

“De acordo com as informações apresentadas no documento anexo à Notificação de Invenção intitulado “Descrição da Solução Proposta pela Invenção” – página 15, linhas 7 a 18 – associadas ao documento D6 que traz uma visão geral do estado da arte referente à ativação do sistema de contato em casos de infecção severa, por que não esperar o papel do cininogênio como marcador nessa etapa do modelo?”

O pesquisador respondeu que: “o documento D6 não compara os níveis líquidos de cininogênio em pacientes com meningites pneumocócica versus meningocócica. Tampouco há relatos na literatura sobre a ativação do sistema de contato em meningites. É preciso ressaltar que tanto o choque séptico por meningococos quanto a síndrome do choque tóxico por estreptococos (*Streptococcus pyogenes*, e não pneumococos), ambas infecções severas relacionadas à ativação do sistema de contato, são doenças diferentes das meningites.”

B. Quanto ao questionamento “II” do parecer, abaixo transcrito:

“Considerando os documentos D2 e D7 que correlacionam a alteração dos níveis de ceruloplasmina no líquido de pacientes com meningite bacteriana e meningite linfocitária, respectivamente, por que não esperar que essa proteína tenha papel como biomarcador na diferenciação proposta no modelo?”

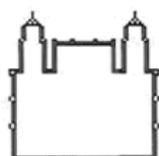
O pesquisador respondeu que: “os documentos D2 e D7 compararam os níveis líquidos de ceruloplasmina em indivíduos controle, pacientes com meningite viral, e pacientes com meningite bacteriana (causadas por diferentes patógenos bacterianos, inclusive meningococos e pneumococos), mas não compararam os níveis desta proteína entre pacientes com meningite bacteriana por pneumococos e pacientes com meningite bacteriana por meningococos, como nós fizemos neste trabalho.”

C. Quanto ao questionamento “III” do parecer, abaixo transcrito:

“Considerando as perspectivas apresentadas no documento anexo à Notificação de Invenção intitulado “Descrição da Solução Proposta pela Invenção” – página 15 – é possível que a invenção seja utilizada em plataformas diagnósticas automatizadas?”

O pesquisador respondeu que há possibilidade de automatização do modelo e que já existe uma parceria estabelecida com a empresa Bioaptus para o desenvolvimento de um kit diagnóstico.

Além das respostas aos questionamentos contidos no Parecer 03/13, foram explicitados os seguintes pontos:



- D. A figura representativa do modelo preditivo (figura 1 do parecer 03/13) foi alterada quanto à diferenciação proposta na etapa 1 do modelo. O pesquisador explicou que a Apolipoproteína 1 não foi capaz de garantir o diagnóstico diferencial entre os indivíduos com meningite viral e aqueles do grupo controle conforme mostrado na tabela 1.

Figura 1: Modelo Preditivo Alterado.

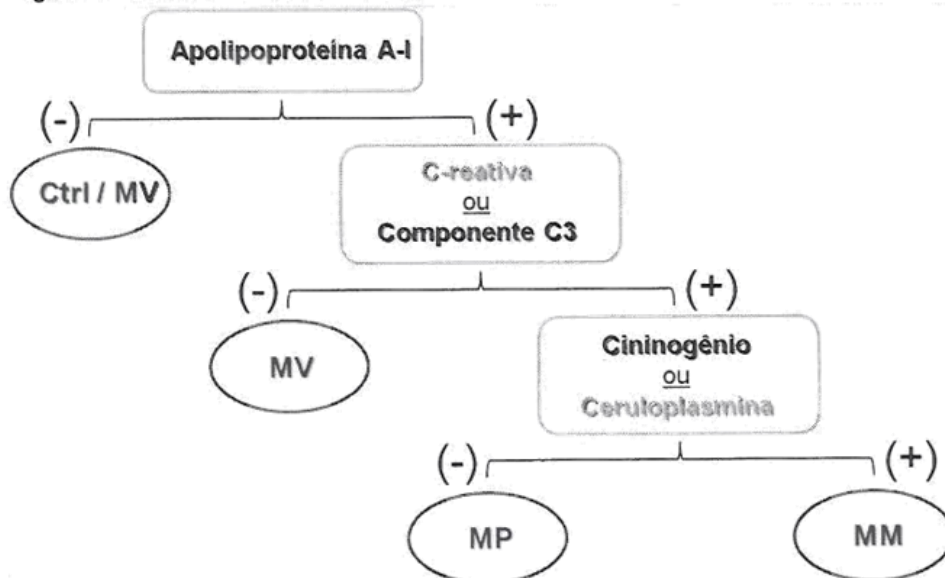
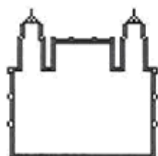


Tabela 1: Matriz de presença/ ausência das proteínas selecionadas para composição do modelo preditivo qualitativo.

Spot	Uniprot	gi	DESCRIÇÃO	∩ MP	∩ MM	∩ MV	U MP	U MM	U MV	U Ctrl
m.31 / p.21	P02647	90108664	Apolipoproteína A-I	1	1	0	1	1	1	0
m.29 / p.20	P02741	1942435	C-reativa	1	1	0	1	1	0	1
p.16 / m.25	P01024	179665	Componente C3	1	1	0	1	1	0	0
m.17	P01042	4504893	Cinínogênio	0	1	0	0	1	0	0
m.1	Q1L857	1620909	Ceruloplasmina	0	1	0	0	1	1	1

∩: subconjunto interseção; U: conjunto união; MP: meningite pneumocócica; MM: meningite meningocócica; MV: meningite viral; CTRL: controle.

- E. O pesquisador justificou o uso de duas possibilidades de biomarcadores para as diferenciações das etapas 2 e 3 do modelo: "a possibilidade de se testarem a presença de duas proteínas diferentes em cada uma destas etapas aumenta a robustez do modelo na medida em que resultados falsos positivos, ou falsos negativos em dois testes são menos prováveis do que em apenas um deles. Além disso, eventuais casos variantes verdadeiros para presença ou ausência destas proteínas, que não ocorreram na casuística usada neste trabalho, têm menor chance de apresentarem variações reais na expressão das duas proteínas do que em apenas uma."
- F. O pesquisador justificou porque o modelo deve ser considerado como um processo único e não fragmentado em etapas independentes: "a especificidade de cada uma das três etapas depende das etapas anteriores. A presença de ceruloplasmina no



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz
Presidência

líquor distingue perfeitamente os pacientes com meningite meningocócica daqueles com a forma pneumocócica, mas não garante a exclusão dos casos de meningite viral e controles uma vez que esta proteína ocorre nos conjuntos união deste dois últimos grupos. Da mesma forma, a presença no líquido da proteína c-reativa basta para distinguir os pacientes com meningites bacterianas daqueles com meningites virais, mas não é suficiente para evitar resultados falsos positivos uma vez que casos controles eventuais com níveis detectáveis desta proteína no líquido foram observados entre a casuística deste trabalho (esta proteína ocorre no grupo união dos controles)."

CONCLUSÃO

Os apontamentos apresentados no Parecer 03/13 foram esclarecidos. Os esclarecimentos adicionais foram essenciais para a melhor compreensão da invenção, e permitiram a visualização do modelo como um processo único onde cada uma das três etapas depende das etapas anteriores.

Quando da realização da busca de anterioridades para a elaboração do Parecer 03/13 também foi observado se a proposta de um modelo como um processo único de etapas dependentes estava descrita no estado da arte. Até o momento, no conjunto de bases de dados pesquisadas, não foi encontrado documento que descrevesse a invenção tal como apresentada na Notificação de Invenção.

A partir das informações prestadas pelo grupo de pesquisa as quais evidenciaram a invenção como um processo único de etapas interdependentes, ainda que não descartadas as observações contidas no Parecer 03/13 quanto à aplicação das proteínas apolipoproteína A-I, proteína C-reativa e complemento C3 como biomarcadores no diagnóstico da meningite, consideramos que a invenção apresentada constitui matéria passível de proteção patentária. Assim, sugerimos que a mesma seja encaminhada para avaliação da Comissão de Propriedade Intelectual da Fiocruz (COPAT).

Este é o parecer, salvo melhor entendimento.

Rio de Janeiro, 03 de junho de 2013.

Érica Riskalla Anchite Vieira, MSc
Analista de Gestão em Saúde
Mat. SIAPE: 1957155
Área de Patentes
Coordenação de Gestão Tecnológica
Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde
Presidência/FIOCRUZ

9 APÊNDICES

9.1 Tabela A.1: Identificação por espectrometria de massas dos spots correspondentes ao conjunto interseção formado por géis 2D de proteínas do liquor de pacientes com meningite pneumocócica

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	Score MASCOT	Peptídeo	m/z value
p.1	α -2-HS-glicoproteína	gi 112910	46 (42)	K. HTLNQIDEVK. V	1196.6484
p.2	α -1-antitripsina	gi 6137432	20 (43) 27 (43) 90 (43) 127 (44)	K. FLENEDRR. S K. ITPNLAEFAFSLYR. Q K. TDTSHHDQDHPTFNK. I K. VFSNGADLSGVTEEEAPLK. L + Deamidated (NQ)	1078.5624 1641.8563 1779.7550 1834.8959
p.3	α -1-antitripsina	gi 6137432	53 (41) 60 (41) 114 (44)	K. SVLGQLGITK. V K. LSITGTYDLK. S K. VFSNGADLSGVTEEEAPLK. L	1015.6166 1110.6206 1834.8824
p.4	α -1-antitripsina	gi 6137432	28 (43)	K. ITPNLAEFAFSLYR. Q	1641.8239
p.5	α -1-antitripsina	gi 6137432	30 (43) 50 (43) 83 (43) 95 (44) 62 (43)	K. FLENEDRR. S K. ITPNLAEFAFSLYR. Q K. TDTSHHDQDHPTFNK. I K. VFSNGADLSGVTEEEAPLK. L K. DTEEEEDFHVDQVTTVK. V	1078.5604 1641.8469 1779.7557 1834.8989 1891.8352
	α -1-antiquimiotripsina	gi 443345	22 (43)	R. LYGSEAFATDFQDSAAAK. K	1891.8352
p.6	α -1 H Tro	gi 223069	54 (44)	R. QQPSQGTTFFAVTSILR. V + Deamidated (NQ)	1818.8972
p.7	α -1-antitripsina	gi 6137432	70 (39) 30 (43) 65 (40) 75 (43)	K. SVLGQLGITK. V K. FLENEDRR. S K. LSITGTYDLK. S K. ITPNLAEFAFSLYR. Q	1015.6609 1078.5604 1110.6461 1641.8652
			113 (43)	K. TDTSHHDQDHPTFNK. I	1779.7633

			120 (44)	K. VFSNGADLSGVTEEAPLK. L	1833.9133
			81 (44)	K. DTEEDDFHVDQVTTVK. V	1891.8510
	α -1-antiquimiotripsina	gi 443345	21 (44)	R. LYGSEAFATDFQDSAAAK. K	1891.8510
	Proteína ligadora de vitamina D	gi 181482	16 (42)	K. YTFELSR. R	915.5212
			21 (40)	K. HLSLLTTLNLR. V	1254.7471
			51 (43)	R. VCSQYAAYGEK. K + Carbamidomethyl (C)	1275.6353
			66 (43)	K. VMDKYTFELSR. R	1388.7065
			68 (43)	K. EDFTSLSLVLYSR. K	1529.7926
p.8	Hemopexina	gi 386789	36 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q	1220.6251
	α fibrinogênio	gi 223918	17 (39)	K. ELRTGKEK. V	960.6070
	Albumina	gi 28592	17 (40)	K. YLYEIAR. R	927.5439
			36 (39)	K. FQNALLVR. Y	960.6070
			50 (42)	K. LVNEVTEFAK. T	1149.6437
			24 (42)	K. KVPQVSTPTLVEVSR. N	1639.9290
			69 (44)	R. RPCFSALEVDETYVPK. E + Carbamidomethyl (C)	1910.9218
p.9	Domínio pacsin 1 F-Bar	gi 377656250	46 (41)	K. EEKLANTR. E	960.5885
	Hemopexina	gi 386789	45 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q	1220.6201
			37 (43)	R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6808
	Albumina	gi 28592	41 (40)	K. YLYEIAR. R	927.5329
			53 (41)	K. FQNALLVR. Y	960.5885
			18 (43)	K. KVPQVSTPTLVEVSR. N	1639.8928
			32 (44)	R. RPCFSALEVDETYVPK. E + Carbamidomethyl (C)	1910.9150
p.10	Albumina	gi 28592	40 (40)	K. YLYEIAR. R	927.5446
			55 (40)	K. FQNALLVR. Y	960.6020
			67 (43)	K. LVNEVTEFAK. T	1149.6398
			80 (43)	K. AVMDDDFAAFVEK. C	1342.6498
			75 (43)	K. ADDKETCFEEGKK. L + Carbamidomethyl (C)	1627.7191
			50 (42)	K. KVPQVSTPTLVEVSR. N	1639.9276
			53 (44)	R. RPCFSALEVDETYVPK. E + Carbamidomethyl (C)	1910.9055
	Domínio pacsin 1 F-Bar	gi 377656250	40 (40)	K. EEKLANTR. E	960.6020
	Hemopexina	gi 386789	48 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q	1220.6229

			39 (43)	R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6820
p.11	Domínio pacsin 1 F-Bar Albumina	gi 377656250 gi 28592	35 (40)	K. EEKLANTR. E	960.5885
			20 (40)	K. YLYEIAR. R	927.5324
			38 (40)	K. FQNALLVR. Y	960.5971
			44 (42)	K. LVNEVTEFAK. T	1149.6434
			78 (44)	K. VFDEFKPLVEEPQNLIK. Q	2045.0726
	Hemopexina	gi 386789	14 (43)	R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6926
p.13	Transferrina	gi 115394517	12 (42)	K. DSGFQMNQLR. G	1195.5800
			17 (42)	K. EGYGYTGAFR. C	1283.5923
p.14	Transferrina	gi 115394517	9 (42)	K. ASYLDCIR. A + Carbamidomethyl (C)	997.5179
			42 (42)	K. DSGFQMNQLR. G	1195.5739
			65 (43)	K. SASDLTWDNLK. G	1249.6271
			47 (42)	K. EGYGYTGAFR. C	1283.5854
			57 (43)	K. MYLGYEYVTAIR. N	1478.7371
			97 (43)	K. CSTSSLLEACTFR. R + Carbamidomethyl (C)	1514.6627
			65 (43)	R. FDEFFSEGCAPGSK. K + Carbamidomethyl (C)	1577.6532
			125 (43)	K. NLNEKDYEELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	1952.9087
			26 (39)	R. APNHAVVTR. K	964.5887
			24 (42)	K. DSGFQMNQLR. G	1195.5852
p.15	Transferrina	gi 115394517	64 (43)	K. SASDLTWDNLK. G	1249.6327
			48 (43)	R. WCAVSEHEATK. C + Carbamidomethyl (C)	1317.6190
p.16	Componente C3 do complemento	gi 179665	47 (44)	K. TIYTPGSTVLRY. I	1370.7386
			27 (43)	R. IPIEDGSGEVVLSR. K	1470.7778
			45 (43)	R. LVAYYTLIGASGQR. E	1511.8160
p.17	Haptoglobina	gi 306882	58 (42)	K. GSFPWQAK. M	920.5112
			21 (41)	R. VGYVSGWGR. N	980.5301
p.18	Haptoglobina	gi 306882	34 (42)	K. GSFPWQAK. M	920.5104
			53 (41)	R. VGYVSGWGR. N	980.5269

			74 (43)	K. VTSIQDWVQK. T	1203.6508
			58 (42)	K. DIAPTLTLYVGK. K	1290.7389
			66 (43)	K. SCAVAEYGVYVK. V	1345.6543
			35 (44)	K. YVMLPVADQDQCIR. H + Carbamidomethyl (C)	1723.7959
	Fragmento D do fibrinogênio	gi 2781208	22 (41)	R. QDGSVDGFR. K	980.5269
p.19	Haptoglobina	gi 306882	39 (41)	K. GSFPWQAK. M	920.5261
			37 (41)	R. VGYVSGWGR. N	980.5430
			47 (43)	K. VTSIQDWVQK. T + Deamidated (NQ)	1203.6700
			34 (44)	K. SCAVAEYGVYVK. V + Carbamidomethyl (C)	1345.6714
p.20	C-reativa	gi 1942435	63 (43)	R. GYSIFSATKR. Q	1136.5846
			16 (43)	K. RQDNEILIFWSK. D	1548.8040
			103 (44)	K. YEVQGEVFTKPQLWP.	1820.8853
	Fragmento Fab do anticorpo A.17	gi 347447253	29 (45)	K. SGTASVVCLLNNFYPR. E + Carbamidomethyl (C)	1797.8544
			37 (44)	K. VYACEVTHQGLSSPVT. S + Carbamidomethyl (C)	1875.8925
			49 (43)	R. TVAAPSVFIFPPSDEQLK. S	1945.9917
	Len, Bence-Jones	gi 229528	29 (45)	K. SGTASVVCLLNNFYPR. E + Carbamidomethyl (C)	1797.8544
			37 (44)	K. VYACEVTHQGLSSPVT. S + Carbamidomethyl (C)	1875.8925
			49 (43)	R. TVAAPSVFIFPPSDEQLK. S	1945.9917
p.21	Apolipoproteína AI	gi 90108664	63 (39)	K. AKPALEDLR. Q	1012.6161
			55 (43)	K. LSPLGEEMR. D	1031.5541
			69 (41)	R. QGLLPVLESFK. V + Gln ->pyro-Glu (N-term Q)	1213.7053
			61 (42)	K. VQPYLDDFQK. K	1252.6372
			61 (42)	K. WQEEMELYR. Q	1283.5863
			66 (43)	R. THLAPYSDEL. Q	1301.6615
			91 (43)	K. VSFLSALEEYTK. K	1386.7219
			113 (43)	R. DYVSQFEGSALGK. Q	1400.6720
			95 (41)	R. VKDLATVYVDVLK. D	1462.8552
			136 (44)	K. LLDNWDSVTSTFSK. L	1612.7783

p.22	Transtiretina	gi 17942890	20 (42)	R. GSPAINVAVHVFR. K	1366.7582
p.23	Transtiretina	gi 17942890	112 (42)	R. GSPAINVAVHVFR. K	1366.7637
			88 (42)	K. AADDTWEPFASGK. T	1394.6217
			74 (43)	R. KAADDTWEPFASGK. T	1522.
					7123
			55 (43)	K. TSESGELHGLTTEEEFVEGIYK. V	2451.1470
			74 (43)	R. YTIAAMLSPYSYSTTAVVTNPKE.	2490.2471

O valor de *score* mostrado é referente a cada peptídeo identificado; o número em parênteses indica o *score* mínimo que denota identidade da proteína. O *spot* p.12 não foi identificado na análise MS/MS. m/z: razão massa carga.

9.2 Tabela A.2: Identificação por espectrometria de massas dos *spots* correspondentes ao conjunto interseção formado por géis 2D de proteínas do liquor de pacientes com meningite meningocócica

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	Score MASCOT	Peptídeo	m/z value
m.1	Ceruloplasmina	gi 1620909	9 (42)	R. QYTDSTFR. V + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	1000.4907
			28 (42)	R. IYHSHIDAPK. D	1180.6500
			46 (43)	R. EYTDASFTNR. K	1203.5680
			50 (42)	K. GAYPLSIEPIGVR. F	1371.7885
			34 (42)	R. QSEDSTFYLGGER. T + Gln->pyro-Glu (N-term Q)	1414.6404
			64 (44)	K. ALYLQYTDETFR. T	1519.7605
			67 (43)	K. DLYSGLIGPLIVCR. R + Carbamidomethyl	1575.8719
			41 (43)	K. NNETYYSNPYNPQSR. S	1903.8165
			31 (44)	R. TYYIAAVEVEWDYSPQR. E	2089.9727
			27 (44)	K. LISVDTEHSNIYLNQGPDR. I + Deamidated (NQ)	2172.0273
m.2	α -1-B-Glicoproteína	gi 69990	11 (43)	K. HQFLLTGDTQGR. Y	1372.6873
			48 (43)	R. CEGPIPDVTFELLR. E	1628.7729
			34 (43)	K. VTLTCVAPLSGVDFQLR. R + Carbamidomethyl (C)	1875.9561

m.3	α -1-B-Glicoproteína	gi 69990	23 (43) 45 (43) 66 (43) 14 (43) 52 (43)	R. ATWSGAVLAGR. D K. HQFLTGTQGR. Y R. CEGPIPDVTFELLR. E R. LELHVDGPPRPQLR. A K. VTLTCVAPLSGVDFQLR. R	1088.6099 1372.6996 1628.7813 1723.9382 1875.9607
m.4	Receptor de célula T cadeia β	gi 78101492	11 (44)	R. GTEKLFFGSGTQLSVLEDLNK. V + Deamidated (NQ)	2284.1392
m.5	Hemopexina	gi 386789	23 (43)	R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6750
m.6	Hemopexina	gi 386789	24 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q	1220.6332
	Hemopexina		23 (43)	R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6949
m.7	Hemopexina	gi 386789	31 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q	1220.6251
	Hemopexina		27 (43)	R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6793
m.8	Hemopexina	gi 386789	8 (43) 3 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1220.6320 1495.6924
m.9	Receptor de célula T cadeia β	gi 78101492	10 (44)	R. GTEKLFFGSGTQLSVLEDLNK. V + Deamidated (NQ)	2284.1384
m.10	Transferrina	gi 115394517	19 (42) 24 (43)	K. EGYGYTGAFR. C K. MYLGYEYVTAIR. N	1283.5924 1478.7450
m.11	Transferrina	gi 115394517	14 (42) 20 (42) 45 (43) 47 (43) 45 (43) 60 (42) 75 (43) 44 (43) 51 (43) 42 (44) 77 (44)	K. ASYLDCIR. A + Carbamidomethyl (C) K. KASYLDCIR. A + Carbamidomethyl (C) K. DSGFQMNQLR. G + Deamidated (NQ); Oxidation (M) K. SASDLTWDNLK. G + Deamidated (NQ) K. HSTIFENLANK. A K. EGYGYTGAFR. C K. MYLGYEYVTAIR. N K. CSTSSLLEACTFR. R + Carbamidomethyl (C) R. KPVEEYANCHLAR. A + Carbamidomethyl (C) K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C) K. NLNEKDYELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	997.5162 1125.6018 1195.5746 1249.6243 1273.6764 1283.5868 1478.7399 1514.6646 1586.7749 1881.8542 1952.9028

m.12	Transferrina	gi 115394517	36 (41)	K. ASYLDCIR. A + Carbamidomethyl (C)	997.5218
			32 (42)	K. KASYLDCIR. A + Carbamidomethyl (C)	1125.6056
			36 (43)	K. DSGFQMNLQR. G	1195.5784
			89 (43)	K. SASDLTWDNLK. G	1249.6293
			98 (42)	K. EGYGYTGAFR. C	1283.5939
			108 (43)	K. MYLGYEYVTAIR. N + Oxidation (M)	1478.7460
			85 (43)	K. CSTSSLLEACTFR. R + Carbamidomethyl (C)	1514.6678
			82 (43)	R. KPVEEYANCHLAR. A + Carbamidomethyl (C)	1586.7783
			74 (44)	K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C)	1881.8623
			155 (44)	K. NLNEKDYELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	1952.9233
			92 (44)	R. SAGWNIPIGLLYCDLPEPR. K + Carbamidomethyl (C)	2171.0652
			145 (44)	R. KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR. S + Carbamidomethyl (C)	2549.2617
m.13	Transferrina	gi 115394517	6 (41)	R. APNHAVVTR. K	964.5632
m.14	TF	gi 118142818	80 (71)	K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C)	1881.8701
			33 (70)	N. KADRDQYELLCLDNTR. K	1952.9344
			110 (70)	R. SAGWNIPIGLLYCDLPEPR. K + Carbamidomethyl (C)	2171.0962
			156 (70)	R. KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR. S + Carbamidomethyl (C)	2549.2991
m.15	α -1 antiquimiotripsina	gi 177933	13 (40)	K. ITLLSALVETR. T	1215.7537
m.16	α -1-antitripsina	gi 6137432	17 (43)	K. FLENEDRR. S	1078.5619
			33 (43)	R. LGMFNIQHCK. K + Carbamidomethyl (C)	1247.6222
			19 (43)	K. GKWERPFVK. D	1275.7043
			19 (43)	K. ITPNLAEFAFSLYR. Q	1641.8546
			46 (43)	K. TDTSHHDQDHPTFNK. I + Deamidated (NQ)	1779.7521
			90 (44)	K. LQHLENELTHDIITK. F	1803.9475
			110 (43)	K. VFSNGADLSGVTEEAPLK. L	1834.9004
			72 (44)	K. DTEEDFHVDQVTTK. V	1891.8423
			95 (44)	K. LYHSEAFVNFVDTEEAKK. Q	2186.0049
m.17	α -1-antitripsina	gi 6137432	55 (39)	K. SVLGQLGITK. V	1015.6539
			28 (43)	K. FLENEDRR. S	1078.5568
			38 (43)	R. LGMFNIQHCK. K + Carbamidomethyl (C)	1247.6217

			23 (43)	K. GKWERPFVK. D	1275.6965
			94 (43)	K. ITPNLAFAFSLYR. Q	1641.8499
			105 (43)	K. TDTSHHDQDHPTFNK. I + Deamidated (NQ)	1779.7472
			93 (44)	K. VFSNGADLSGVTEEAPLK. L + Deamidated (NQ)	1834.9005
			78 (43)	K. DTEEDDFHVDQVTTK. V	1891.8333
	Cininogênio	gi 4504893	38 (41)	R. QVVAGLNFR. I + Gln->pyro-Glu	986.5857
			56 (43)	K. YFIDFVAR. E	1030.5787
			74 (44)	K. YNSQNQSNQFVLYR. I	1874.9221
m.18	Proteína ligadora de vitamina D	gi 181482	69 (43)	R. VCSQYAAAYGEK. K + Carbamidomethyl (C)	1275.5880
			106 (43)	K. SLGECCDVEDSTTCFNAK. G + 3 Carbamidomethyl (C)	2093.7988
			74 (42)	K. SCESNSPFPVHPGTAECCTK. E + 3 Carbamidomethyl (C)	2264.8989
m.19	Proteína ligadora de vitamina D	gi 181482	10 (42)	K. YTFELSR. R	915.5093
			46 (41)	R. THLPEVFLSK. V	1170.6786
			66 (43)	R. VCSQYAAAYGEK. K + Carbamidomethyl (C)	1275.5879
			15 (42)	R. RTHLPEVFLSK. V	1326.7697
			33 (43)	K. VMDKYTFELSR. R + Oxidation (M)	1404.6991
			66 (43)	K. EDFTSLSLVLYSR. K	1529.7881
			98 (44)	R. KFPSGTFEQVSQVLK. E	1694.9034
			83 (43)	K. SLGECCDVEDSTTCFNAK. G + 2 Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ)	2092.7935
			93 (43)	K. SCESNSPFPVHPGTAECCTK. E + 2 Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ)	2264.9041
			41 (41)	K. EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR. T +3 Carbamidomethyl (C)	2517.9680
			88 (44)	K. HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR. K + Carbamidomethyl (C)	2707.1350
m.20	α -1-antitripsina	gi 6137432	24 (42)	K. FLENEDRR. S	1078.5770
			69 (43)	K. ITPNLAFAFSLYR. Q	1641.9111
			66 (43)	K. TDTSHHDQDHPTFNK. I + Deamidated (NQ)	1779.8087
			67 (43)	K. VFSNGADLSGVTEEAPLK. L	1833.9686

			73 (44)	K. DTEEDFHVDQVTTK. V	1891.9086
			75 (44)	K. LYHSEFTVNFQDTEEAKK. Q	2186.0857
	cDNA FLJ75500, similar ao domínio EH	gi 158258527	13 (42)	R. KALATSSINMK. Q + Deamidated (NQ); Oxidation (M)	1180.6589
	Proteína associada à microtúbulo 1a	gi 1790878	20 (42)	R. KVSGEREEEEGR. A	1275.7413
m.21	α -1-antitripsina	gi 6137432	11 (43)	K. ITPNLAEFAFSLYR. Q + Deamidated (NQ)	1642.9083
m.22	α -1-Glicoproteína ácida	gi 112877	70 (71)	K. EQLGEFYEALDCLR. I	1685.8094
			124 (71)	K. EQLGEFYEALDCLR. I + Carbamidomethyl (C)	1742.8320
			121 (71)	R. YVGGQEHFAHLILR. D	1752.9852
			182 (70)	K. TYMLAFDVNDEKNWGLSVYADKPETTK. E	3135.5857
m.23	α -1-Glicoproteína ácida	gi 112877	40 (41)	K. TEDTIFLR. E	994.5594
			63 (42)	K. SDVVYTDWK. K	1112.5554
			70 (43)	K. WFIASAFR. N	1160.6144
			57 (42)	K. SDVVYTDWK. D	1240.6398
			74 (43)	K. TYMLAFDVNDEK. N + Deamidated (NQ)	1445.6697
			77 (43)	K. EQLGEFYEALDCLR. I + Carbamidomethyl (C)	1724.7810
			143 (43)	K. EQLGEFYEALDCLR. I + Carbamidomethyl (C)	1742.7928
			36 (44)	R. YVGGQEHFAHLLTLR. D	1752.9379
			80 (43)	K. EQLGEFYEALDCLR. I + Carbamidomethyl (C)	1770.8234
m.24	Haptoglobina	gi 123508	41 (50)	K. GSFPWQAK. M	920.43
			63 (44)	R. VGYVSGWGR. N	980.46
			40 (45)	K. VTSIQDWVQK. T	1203.56
			42 (47)	K. SCAVAEYGVYVK. V + Carbamidomethyl (C)	1345.57
			70 (45)	K. YVMLPVADQDQCIR. H + Carbamidomethyl (C)	1707.74
m.25	Zn- α -2-glicoproteína	gi 38026	18 (39)	K.IDVHWTR. A	926.5369
			18 (43)	K. AYLEEECPATLR. K + Carbamidomethyl (C)	1451.6829
			31 (43)	K. QKWEAEPVYVQR. A + Gln->pyro-Glu	1515.7563
	Componente C3 do complemento	gi 179665	13 (43)	K. SGSDEVQVGQQR. T	1289.6248
			20 (43)	K. VYAYYNLEESCTR. F + Carbamidomethyl (C)	1667.7285

m.26	Zn-α-2-glicoproteína	gi 38026	48 (40)	K. IDVHWTR. A	926.5352
			22 (43)	K. SQPMGLWR. Q	974.5259
			15 (42)	R. AGEVQEPRL. G	1127.5963
			16 (43)	K. WEAEPVYVQR. A	1276.6530
			16 (45)	K. AREDIFMETLK. D	1352.6990
			39 (43)	K. AYLEEECPATLR. K + Carbamidomethyl (C)	1451.6924
			26 (43)	K. QKWEAEPVYVQR. A + Gln->pyro-Glu	1515.7596
			53 (43)	K. YYYYDGKDYIEFNK. E	1717.7729
m.27	Haptoglobina	gi 123508	45 (44)	K. GSFPWQAK. M	920.4396
			86 (44)	R. VGYVSGWGR. N	980.4176
			64 (44)	K. VTSIQDWVQK. T	1203.5730
			36 (44)	K. DIAPTLTLYVGH. K	1290.6548
			89 (44)	K. SCAVAEYGVYVK. V + Carbamidomethyl (C)	1345.5769
			96 (44)	K. YVMLPVADQDQCIR. H + Carbamidomethyl (C)	1707.7610
			31 (44)	R. VMPICLPSKDYAEVGR. V + Carbamidomethyl (C)	1834.8649
			68 (44)	K. SPVGVQPILNEHTFCAGMSK. Y + Carbamidomethyl (C)	2171.9683
m.28	Haptoglobina	gi 306882	17 (42)	K. GSFPWAK. M	920.5186
			12 (41)	R. VGYVSGWGR. N	980.5317
m.29	C-reativa	gi 1942435	72 (70)	R. GYSIFSYATKR. R	1136.5562
			49 (70)	K. RQDNEILIFWSK. D	1548.8180
	Receptor de célula T cadeia β	gi 78101492	119 (70)	K. YEVQGEVFTKPQLWP.	1820.8986
			7 (44)	R. GTEKLFFGSGTQLSVLEDLNK. V + Deamidated (NQ)	2284.1289
m.30	Proapo-AI	gi 178777	76 (71)	K. AKPALEDLR. Q	1012.5901
			39 (71)	K. LSPLGEEMR. D	1031.5320
			60 (71)	R. QGLLPVLESFK. V + Gln->pyro-Glu	1213.6842
			49 (70)	Q. DEPPQSPWDR. V	1226.5494
			48 (71)	K. VQPYLDDFQK. K	1252.6139
			49 (70)	K. WQEEMELYR. Q	1283.5789

			72 (71)	R. THLAPYSDEL.R. Q	1301.6514
			86 (71)	K. VSFLSALEEYTK. K	1386.7015
			106 (71)	R. DYVSQFEGSALGK. Q	1400.6561
			65 (71)	K. KWQEEMELYR. Q	1411.6685
			73 (71)	R. VKDLATVYVDVLK. D	1462.8413
			110 (71)	K. LLDNWDSVTSTFSK. L	1612.7679
m.31	Apolipoproteína AI	gi 90108664	38 (43)	R. THLAPYSDEL.R. Q	1301.6545
			89 (43)	R. DYVSQFEGSALGK. Q	1400.6689
m.32	Transtiretina	gi 17942890	9 (41)	R. GSPAINVAVHCFR. K	1366.7832
m.33	Transtiretina	gi 443295	118 (42)	R. GSPAINVAVHVFR. K	1366.7766
			101 (43)	K. AADDTWEPFASGK. T	1394.6401
			34 (42)	R. GSPAINVAVHVFRK. A	1494.8654
			110 (43)	R. KAADDTWEPFASGK. T	1522.7278
			167 (44)	R. YTIIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2360.2478
			136 (44)	K. ALGISPFHEHADEVFTANDSGPR. R	2451.1907
			110 (44)	R. RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2516.3130
			140 (44)	R. RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK.-	2645.3618
			202 (44)	K. TSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTK. S	3140.5383

O valor de *score* mostrado é referente a cada peptídeo identificado; o número em parênteses indica o *score* mínimo que denota identidade da proteína. m/z: razão massa carga.

9.3 Tabela A.3: Identificação por espectrometria de massas dos *spots* correspondentes ao conjunto interseção formado por géis 2D de proteínas do liquor de pacientes com meningite viral.

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	Score MASCOT	Peptídeo	m/z value
v.5	Não identificado	gi 22761380	5 (44)	-. MGSLYMFVQTILSYQMMPK. I + 3 Deamidated (NQ);	2284.1609

v.6	Não identificado	gi 22761380	9 (44)	Oxidation (M) -. MGSLYMFVQTILSYQMMPK. I + 3 Deamidated (NQ);	2284.1649
	Hemopexina	gi 386789	25 (43)	Oxidation (M) R. YYCFQGNQFLR. F + Carbamidomethyl (C)	1495.6882
			25 (44)	K. SGAQATWTELPWPHEK. V	1837.8870
			21 (44)	K. LLQDEFPGIPSPLDAAVECHR. G + Carbamidomethyl (C)	2364.1501
v.8	Hemopexina	gi 386789	15 (43)	K. NFPSPVDAAFR. Q	1220.6335
v.9	Não identificado	gi 22761380	12 (44)	-. MGSLYMFVQTILSYQMMPK. I + 3 Deamidated (NQ);	2284.2402
v.10	Transferrina	gi 110590597	9 (42)	Oxidation (M) K. EGYGYTGAFR. C	1283.5922
			10 (42)	K. NLNEKDYEELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C);	1953.9575
v.11	Transferrina	gi 110590597	6 (42)	Deamidated (NQ) K. EGYGYTGAFR. C	1283.6077
			3 (43)	K. DSGFQTNQLRGKK. S	1478.7473
			5 (43)	K. MYLGYEYVTAIR. N	1478.7632
			4 (43)	R. KPVEEYANCHLAR. A + Carbamidomethyl (C)	1586.7977
			26 (44)	K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C)	1881.8879
			30 (44)	K. NLNEKDYEELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	1952.9518
			49 (44)	R. SAGWNIPIGLLYCDLPEPR. K + Carbamidomethyl (C)	2171.1042
			25 (44)	R. KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR. S + Carbamidomethyl (C)	2549.2932
			16 (43)	K. SASDLTWDNLK. G	1249.6357
			21 (43)	K. EFQLFSSPHGK. D	1276.6638
v.12	Transferrina	gi 110590597	27 (42)	K. EGYGYTGAFR. C	1283.6039
			28 (43)	K. MYLGYEYVTAIR. N	1478.7559
			59 (42)	R. FDEFFSEGCAPGSK. K	1577.6672
			33 (43)	R. KPVEEYANCHLAR. A + Carbamidomethyl (C)	1586.7976
			34 (44)	K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C)	1881.8760
			38 (44)	K. NLNEKDYEELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	1952.9398
			36 (44)	R. SAGWNIPIGLLYCDLPEPR. K + Carbamidomethyl (C)	2172.1035
			35 (44)	R. KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR. S + Carbamidomethyl (C)	2549.2590
			22 (42)	K. DSTLIHQLLR. D	1195.5767
	Triptofano 5 tirosina	gi 380765197	22 (42)		

monooxygenase 3					
v.13	Transferrina	gi 110590597	19 (42)	K. ASYLDCIR. A + Carbamidomethyl (C)	997.5177
			43 (42)	K. DSGFQMNQLR. G	1195.5760
			96 (42)	K. EGYGYTGAFR. C	1283.5944
			113 (43)	K. MYLGYEYVTAIR. N	1478.7478
			70 (43)	K. DLLFRDDTVCLAK. L + Carbamidomethyl (C)	1565.8069
			78 (42)	R. FDEFFSEGCAPGSK. K + Carbamidomethyl (C)	1577.6677
			102 (43)	R. KPVEEYANCHLAR. A + Carbamidomethyl (C)	1586.7836
			96 (44)	K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C)	1881.8734
			151 (44)	K. NLNEKDYELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	1952.9329
			135 (44)	R. SAGWNIPIGLLYCDLPEPR. K + Carbamidomethyl (C)	2171.0759
	Tryptofano 5 tirosina monooxygenase 3	gi 380765197	24 (42)	R. KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR. S + Carbamidomethyl (C)	2549.2751
				K. DSTLIHQLLR. D	1195.5760
			38 (42)	K. ASYVEQSGR. S + Deamidated (NQ)	997.5177
v.15	Transferrina	gi 110590597	43 (44)	R. SAGWNIPIGLLYCDLPEPR. K + Carbamidomethyl (C)	2172.1672
v.16	Transferrina	gi 110590597	21 (42)	K. EGYGYTGAFR. C	1283.5928
			31 (43)	K. MYLGYEYVTAIR. N	1478.7455
			14 (43)	R. KPVEEYANCHLAR. A + Carbamidomethyl (C)	1586.7769
			27 (44)	K. ADRDQYELLCLDNTR. K + Carbamidomethyl (C)	1881.8617
			54 (44)	K. NLNEKDYELLCLDGTR. K + Carbamidomethyl (C)	1952.9204
			54 (45)	R. KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR. S + Carbamidomethyl (C)	2549.2422
v.17	α -1-antitripsina	gi 177831	31 (43)	K. FLENEDRR. S	1078.5663
			69 (43)	R. LGMFNIQHCK. K + Carbamidomethyl (C)	1247.6283
			27 (43)	K. GKWERPFEVK. D	1275.7087
			10 (43)	K. RLGMFNIQHCK. K + Carbamidomethyl (C)	1403.7201
			139 (43)	K. ITPNLAEFAFSLYR. Q	1641.8651
			105 (43)	K. TDTSHHDQDHPTFNK. I	1779.7688
			112 (44)	K. DTEEDDFHVDQVTTVK. V	1891.8556
			139 (44)	K. LYHSEAF TVNFGDTEEAKK. Q	2186.0315

v.19	Proteína ligadora de vitamina D	gi 181482	14 (42)	K. YTFELSR. R	915.4900
			50 (41)	K. HLSLLTTLSNR. V	1254.7167
			70 (42)	R. VCSQYAAAYGEK. K + Carbamidomethyl (C)	1275.5664
			14 (42)	R. RTHLPEVFLSK. V	1326.7477
			36 (43)	K. VMDKYTFELSR. R	1388.6768
			77 (43)	K. EDFTSLSLVLYSR. K	1529.7632
			103 (44)	R. KFPSGTFEQVSQLVK. E	1694.8849
			64 (42)	K. SCESNSPFPVHPGTAECCTK. E + 3 Carbamidomethyl (C)	2264.8862
			97 (44)	K. HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR. K + Carbamidomethyl (C)	2707.1277
v.20	Proteína ligadora de vitamina D	gi 181482	33 (42)	K. YTFELSR. R	915.4960
			15 (41)	K. HLSLLTTLSNR. V	1254.7196
			55 (42)	R. VCSQYAAAYGEK. K + Carbamidomethyl (C)	1275.5691
			9 (42)	R. RTHLPEVFLSK. V	1326.7471
			53 (43)	K. VMDKYTFELSR. R	1388.6807
			82 (43)	K. EDFTSLSLVLYSR. K	1529.7667
			113 (44)	R. KFPSGTFEQVSQLVK. E	1694.8840
			36 (42)	K. SCESNSPFPVHPGTAECCTK. E + 3 Carbamidomethyl (C)	2264.9001
			57 (44)	K. HQPQEFPTYVEPTNDEICEAFR. K + Carbamidomethyl (C)	2707.1384
v.21	α -1-Gicoproteína ácida	gi 112877	11 (43)	K. WFYIASAFR. N	1160.6144
			25 (44)	K. EQLGEFYEALDCLR. I + Carbamidomethyl (C)	1742.7994
v.22	Transtiretina	gi 443295	107 (42)	R. GSPAINVAVHVFR. K	1366.7566
			90 (42)	K. AADDTWEPFASGK. T	1394.6156
			118 (43)	R. KAADDTWEPFASGK. T	1522.7023
			130 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2360.1946
			122 (44)	K. ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR. R	2451.1460
			24 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2516.2766
			41 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. -	2645.3130

v.23	Transtiretina	gi 443295	115 (42)	R. GSPAINVAVHVFR. K	1366.7736
			98 (43)	K. AADDTWEPFASGK. T	1394.6429
			126 (43)	K. AADDTWEPFASGK. T	1522.7327
			146 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2360.2434
			151 (44)	K. ALGISPFHEHAIEVFTANDSGPR. R	2451.1870
			94 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. -	2489.2832
			70 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2516.3137
			163 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. -	2645.3643
			160 (44)	K. TSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTK. S	3140.5349
v.24	Prostaglandina D sintase	gi 283806778	150 (44)	R. TMLLQPAGSLGSYSYR. S	1743.8582
			16 (44)	R. TMLLQPAGSLGSYSYR. S + Oxidation (M)	1759.8569
			83 (44)	M. APEAQVSVQPNFQQDK. F	1785.8590
			79 (44)	K. AQGFTEDTIVFLPQTDK. C	1909.9354
			55 (44)	R. SPHWGSTYSVVETDYDQYALLYSQGSK. G + Deamidated (NQ)	3268.4792
v.25	Prostaglandina D sintase	gi 283806778	160 (44)	R. TMLLQPAGSLGSYSYR. S	1743.8556
			99 (44)	R. TMLLQPAGSLGSYSYR. S + Oxidation (M)	1759.8490
			131 (44)	M. APEAQVSVQPNFQQDK. F	1785.8569
			133 (44)	K. AQGFTEDTIVFLPQTDK. C	1909.9319
			50 (44)	M. APEAQVSVQPNFQQDK. F + Deamidated (NQ)	2260.0950
			194 (44)	R. SPHWGSTYSVVETDYDQYALLYSQGSK. G	3267.4834
v.27	Transtiretina	gi 443295	110 (42)	R. GSPAINVAVHVFR. K	1366.7717
			101 (43)	K. AADDTWEPFASGK. T	1394.6354
			117 (43)	K. AADDTWEPFASGK. T	1522.7222
			165 (44)	R. YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2360.2156
			127 (44)	K. ALGISPFHEHAIEVFTANDSGPR. R	2451.1714
			93 (44)	R. RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. E	2516.2944
			45 (44)	R. RYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK. -	2645.3413
			185 (44)	K. TSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTK. S	3140.4956

O valor de *score* mostrado é referente a cada peptídeo identificado; o número em parênteses indica o *score* mínimo que denota identidade da proteína. Os *spots* v.1, v.2, v.3, v.4, v.14, v.18 e v.26 não foram identificados na análise MS/MS. m/z: razão massa carga.

9.4 SIGLAS GENEGO

	metaloprotease		proteína
	alfa-G		proteína ligadora genérica
	enzima genérica		receptor de ligação
	quinase genérica		glicoproteína de membrana celular
	proteína quinase		fator de transcrição
	lipídio quinase		composto ou molécula
	fosfatase genérica		íon inorgânico
	proteína fosfatase		metabólito previsto
	lipídio fosfatase		reação
	fosfatase genérica		receptor genérico
	protease genérica		GPCR
			receptor com atividade enzimática
			adaptador

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mace SE. Acute bacterial meningitis. *Emerg Med Clin North Am.* 2008;26(2):281-317, viii.
2. Chávez-Bueno S, McCracken GH. Bacterial meningitis in children. *Pediatr Clin North Am.* 2005;52(3):795-810, vii.
3. Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(2):130-45.
4. Irani DN. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol Clin.* 2008;26(3):635-55, vii-viii.
5. Logan SA, MacMahon E. Viral meningitis. *BMJ.* 2008;336(7634):36-40.
6. Castillo D, Harcourt B, Hatcher C, Jackson M, Katz L, Mair R, et al. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* In: WHO, editor. WHO MANUAL. 2nd ed. Geneva, Switzerland 2011.
7. Siber G, Klugman K, Mäkelä H. Pneumococcal Vaccines 2008. Available from: books.google.com.br.
8. Simell B, Auranen K, Käyhty H, Goldblatt D, Dagan R, O'Brien KL, et al. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(7):841-55.
9. Hill DJ, Griffiths NJ, Borodina E, Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci (Lond).* 2010;118(9):547-64.
10. Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 9):821-32.
11. Murray P. Microbiologia médica. Elsevier Brasil ed 2011.
12. Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(1):3-14.
13. Outbreak news. Outbreak of poliomyelitis, Republic of the Congo, September 2010–February 2011. *Wkly Epidemiol Rec.* 2011;86(15):141-2.
14. Leimkugel J, Adams Forgor A, Gagneux S, Pflüger V, Flierl C, Awine E, et al. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. *J Infect Dis.* 2005;192(2):192-9.
15. Anonymous. Measuring impact of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccination. In: Organization WH, editor. Immunization, Vaccines and Biologicals. Geneva, Switzerland 2012.
16. Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. *J Infect Dis.* 2002;186 Suppl 2:S225-33.
17. 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.
18. 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.
19. Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, et al. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog.* 1990;9(4):275-84.
20. Weiser JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ, Janoff EN. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):4215-20.
21. Mulks MH, Plaut AG, Feldman HA, Frangione B. IgA proteases of two distinct specificities are released by *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med.* 1980;152(5):1442-7.
22. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(4):288-301.
23. Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2003;71(1):218-25.

24. Li J, Glover DT, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun*. 2007;75(12):5877-85.
25. Andersen BM. Endotoxin release from neisseria meningitidis. Relationship between key bacterial characteristics and meningococcal disease. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1989;64:1-43.
26. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.
27. Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(5):2163-7.
28. Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, Lambert PH. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med*. 1988;319(7):397-400.
29. van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Bartelink AK, van Dalen R, Sauerwein RW, van der Meer JW. Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis*. 1995;172(2):433-9.
30. Sellner J, Täuber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol*. 2010;96:1-16.
31. Kim KS. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(8):625-34.
32. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):569-81.
33. Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simbürger E, Horvath T, Gimsa U, et al. Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol*. 2001;168(2):242-9.
34. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*. 2007;28(1):5-11.
35. Join-Lambert O, Morand PC, Carbonnelle E, Coureuil M, Bille E, Bourdoulous S, et al. Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*. *Prog Neurobiol*. 2010;91(2):130-9.
36. Leppert D, Leib SL, Grygar C, Miller KM, Schaad UB, Holländer GA. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin Infect Dis*. 2000;31(1):80-4.
37. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(5):728-35.
38. Paul R, Lorenzl S, Koedel U, Sporer B, Vogel U, Frosch M, et al. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol*. 1998;44(4):592-600.
39. Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapek F, Hebling S, Frosch M. *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000874.
40. Gerber J, Nau R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol*. 2010;23(3):312-8.
41. Täuber MG, Moser B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis*. 1999;28(1):1-11; quiz 2.
42. Rusconi F, Parizzi F, Garlaschi L, Assael BM, Sironi M, Ghezzi P, et al. Interleukin 6 activity in infants and children with bacterial meningitis. The Collaborative Study on Meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1991;10(2):117-21.
43. Gruol DL, Nelson TE. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol*. 1997;15(3):307-39.
44. Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S460-2.

45. Østergaard C, Brandt C, Konradsen HB, Samuelsson S. Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1212-20.
46. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, Roord JJ, van Furth AM. Interleukin-10 negatively regulates local cytokine and chemokine production but does not influence antibacterial host defense during murine pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* 2003;71(4):2276-9.
47. Freyer D, Manz R, Ziegenhorn A, Weih M, Angstwurm K, Döcke WD, et al. Cerebral endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol.* 1999;163(8):4308-14.
48. Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW. Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis.* 2001;183(12):1749-59.
49. Koedel U, Paul R, Winkler F, Kastenbauer S, Huang PL, Pfister HW. Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(11):1041-50.
50. Aycicek A, Iscan A, Erel O, Akcali M, Ocak AR. Oxidant and antioxidant parameters in the treatment of meningitis. *Pediatr Neurol.* 2007;37(2):117-20.
51. BERPpohl D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Braun JS, Bechmann I, et al. Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1607-15.
52. Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI, et al. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest.* 2002;109(1):19-27.
53. Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol.* 2006;80(6):269-80.
54. Cerciello G, Giubilei D. [Modern treatment of post-operative pulmonary complications]. *Clin Ostet Ginecol.* 1962;64:614-23.
55. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res.* 1985;101(1):4-15.
56. Carson DA, Seto S, Wasson DB, Carrera CJ. DNA strand breaks, NAD metabolism, and programmed cell death. *Exp Cell Res.* 1986;164(2):273-81.
57. Pieper AA, Walles T, Wei G, Clements EE, Verma A, Snyder SH, et al. Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption. *Mol Med.* 2000;6(4):271-82.
58. Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Pfister HW. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(1):39-49.
59. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 1987;7(2):369-79.
60. Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 2006;37(1):11-8.
61. Bhatt SM, Lauretano A, Cabellos C, Halpin C, Levine RA, Xu WZ, et al. Progression of hearing loss in experimental pneumococcal meningitis: correlation with cerebrospinal fluid cytochemistry. *J Infect Dis.* 1993;167(3):675-83.
62. Kastenbauer S, Klein M, Koedel U, Pfister HW. Reactive nitrogen species contribute to blood-labyrinth barrier disruption in suppurative labyrinthitis complicating experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Brain Res.* 2001;904(2):208-17.
63. Meli DN, Coimbra RS, Erhart DG, Loquet G, Bellac CL, Täuber MG, et al. Doxycycline reduces mortality and injury to the brain and cochlea in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* 2006;74(7):3890-6.
64. WHO. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. ed2011.

65. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis*. 1995;20(4):971-81.
66. Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr*. 2001;13(1):65-9.
67. Davison A. Overview of classification. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore P, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press 2007
68. Chadwick DR. Viral meningitis. *Br Med Bull*. 2005;75-76:1-14.
69. Azwa A, Barton SE. Aspects of herpes simplex virus: a clinical review. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 2009;35(4):237-42.
70. Whitley R, Kimberlin D, Prober C. Pathogenesis and disease. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore P, Roizman B, Whitley R, et al., editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press;; 2007
71. Gershon AA. Varicella zoster vaccines and their implications for development of HSV vaccines. *Virology*. 2013;435(1):29-36.
72. Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. Neurological disease produced by varicella zoster virus reactivation without rash. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;342:243-53.
73. Schmaljohn A, McClain D. *Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
74. Fredericksen BL. The neuroimmune response to West Nile virus. *J Neurovirol*. 2013.
75. Rumboldt Z, Thurnher MM, Gupta RK. Central nervous system infections. *Semin Roentgenol*. 2007;42(2):62-91.
76. Rotbart HA. Viral meningitis. *Semin Neurol*. 2000;20(3):277-92.
77. MacLone D. *Pediatric neurosurgery*. Sciences EH, editor 2001.
78. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):467-92.
79. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1849-59.
80. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):893-902.
81. Novaes HM, Sartori AM, Soárez PC. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004 - 2006. *Rev Saude Publica*. 2011;45(3):539-47.
82. Ramakrishnan M, Ulland AJ, Steinhardt LC, Moïsi JC, Were F, Levine OS. Sequelae due to bacterial meningitis among African children: a systematic literature review. *BMC Med*. 2009;7:47.
83. Reinert RR, Paradiso P, Fritzell B. Advances in pneumococcal vaccines: the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine received market authorization in Europe. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(3):229-36.
84. Saúde Md. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança. In: *Epidemiológica DdV*, editor. Brasília 2010.
85. OPAS. Informe Regional do SIREVA II: dados por país e por grupos de idade sobre as características dos isolados de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* em processos invasivos. 2009.
86. Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, Harrison LH, Jelfs J, Ladhani SN, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 2:B26-36.
87. Outbreak(s) of Ebola haemorrhagic fever in the Republic of the Congo, January-April 2003. *Wkly Epidemiol Rec*. 2003;78(33):285-9.
88. Meningococcal meningitis. *Wkly Epidemiol Rec*. 2003;78(33):294-6.
89. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine*. 2001;19(17-19):2688-91.

90. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000;287(5459):1816-20.
91. Panatto D, Amicizia D, Lai PL, Gasparini R. Neisseria meningitidis B vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(9):1337-51.
92. Iacobucci G. First meningitis B vaccine could be available in UK next year. *BMJ*. 2012;345:e7867.
93. Sáfadi MA, Cintra OA. Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention. *Neurol Res*. 2010;32(3):263-71.
94. FUNED. Vacina contra meningite [04 Março 2013]. Available from: <http://funed.mg.gov.br/noticias/vacina-contra-meningite>.
95. Imprensa Oficial: Funed produzirá vacina da meningite C 2009 [04 Março 2013]. Available from: <http://www.iof.mg.gov.br/index.php?/acao-do-governo/acao-do-governo-arquivo/Funed-produzira-vacina-da-meningite-C.html>.
96. Introdução da vacina meningocócica C (conjugada) no calendário de vacinação da criança. In: Epidemiológica DdV, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
97. Situação da Doença Meningocócica no Brasil em 2011. Ministério da Saúde; 2012.
98. Dos Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, de Melo MM, Kmetzsch CI, et al. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol*. 2006;78(1):98-104.
99. Kim HJ, Kang B, Hwang S, Hong J, Kim K, Cheon DS. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. *Virology*. 2012;9:38.
100. Reintjes R, Pohle M, Vieth U, Lyytikäinen O, Timm H, Schreier E, et al. Community-wide outbreak of enteroviral illness caused by echovirus 30: a cross-sectional survey and a case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18(2):104-8.
101. Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, et al. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol Infect*. 2000;124(3):497-506.
102. Bedford H, de Louvois J, Halket S, Peckham C, Hurley R, Harvey D. Meningitis in infancy in England and Wales: follow up at age 5 years. *BMJ*. 2001;323(7312):533-6.
103. Momméja-Marin H, Lafaurie M, Scieux C, Galicier L, Oksenhendler E, Molina JM. Herpes simplex virus type 2 as a cause of severe meningitis in immunocompromised adults. *Clin Infect Dis*. 2003;37(11):1527-33.
104. Harford CG, Wellingshoff W, Weinstein RA. Isolation of herpes simplex virus from the cerebrospinal fluid in viral meningitis. *Neurology*. 1975;25(2):198-200.
105. Schlesinger Y, Tebas P, Gaudreault-Keener M, Buller RS, Storch GA. Herpes simplex virus type 2 meningitis in the absence of genital lesions: improved recognition with use of the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis*. 1995;20(4):842-8.
106. Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(1):32-42.
107. Parikh V, Tucci V, Galwankar S. Infections of the nervous system. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2012;2(2):82-97.
108. Branco RG, Tasker RC. Meningococcal meningitis. *Curr Treat Options Neurol*. 2010;12(5):464-74.
109. Welsby PD, Golledge CL. Meningococcal meningitis. *BMJ*. 1990;300(6733):1150-1.
110. Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, et al. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med*. 1993;328(1):21-8.
111. Tacon CL, Flower O. Diagnosis and management of bacterial meningitis in the paediatric population: a review. *Emerg Med Int*. 2012;2012:320309.
112. Ahmed A, Hickey SM, Ehrett S, Trujillo M, Brito F, Goto C, et al. Cerebrospinal fluid values in the term neonate. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15(4):298-303.

113. Conly JM, Ronald AR. Cerebrospinal fluid as a diagnostic body fluid. *Am J Med.* 1983;75(1B):102-8.
114. Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician.* 2003;68(6):1103-8.
115. Hahn SM. Current concepts in bacterial meningitis. *West J Med.* 1989;151(2):180-6.
116. Arevalo CE, Barnes PF, Duda M, Leedom JM. Cerebrospinal fluid cell counts and chemistries in bacterial meningitis. *South Med J.* 1989;82(9):1122-7.
117. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 2004;39(9):1267-84.
118. Nigrovic LE, Kuppermann N, Malley R. Development and validation of a multivariable predictive model to distinguish bacterial from aseptic meningitis in children in the post-*Haemophilus influenzae* era. *Pediatrics.* 2002;110(4):712-9.
119. Nigrovic LE, Kuppermann N, Macias CG, Cannavino CR, Moro-Sutherland DM, Schremmer RD, et al. Clinical prediction rule for identifying children with cerebrospinal fluid pleocytosis at very low risk of bacterial meningitis. *JAMA.* 2007;297(1):52-60.
120. Agüero G, Davenport MC, Del Valle MeL, Gallegos P, Kannemann AL, Bokser V, et al. [Validation of a clinical prediction rule to distinguish bacterial from aseptic meningitis]. *Arch Argent Pediatr.* 2010;108(1):40-4.
121. Close RM, Ejidokun OO, Verlander NQ, Fraser G, Meltzer M, Rehman Y, et al. Early diagnosis model for meningitis supports public health decision making. *J Infect.* 2011;63(1):32-8.
122. Harrell FE, Margolis PA, Gove S, Mason KE, Mulholland EK, Lehmann D, et al. Development of a clinical prediction model for an ordinal outcome: the World Health Organization Multicentre Study of Clinical Signs and Etiological agents of Pneumonia, Sepsis and Meningitis in Young Infants. WHO/ARI Young Infant Multicentre Study Group. *Stat Med.* 1998;17(8):909-44.
123. Hoen B. [Differentiating bacterial from viral meningitis: contribution of nonmicrobiological laboratory tests]. *Med Mal Infect.* 2009;39(7-8):468-72.
124. Jaeger F, Leroy J, Duchêne F, Baty V, Baillet S, Estavoyer JM, et al. Validation of a diagnosis model for differentiating bacterial from viral meningitis in infants and children under 3.5 years of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(6):418-21.
125. Kaplan SL. Clinical presentations, diagnosis, and prognostic factors of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13(3):579-94, vi-vii.
126. Bohr V, Rasmussen N, Hansen B, Kjersem H, Jessen O, Johnsen N, et al. 875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and the impact of preadmission antibiotic therapy. Part III of a three-part series. *J Infect.* 1983;7(3):193-202.
127. Anonymous. Técnica de Coloração de GRAM. In: Saúde Md, editor. Programa Nacional de DST e Aids. Brasília 2001.
128. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(4):1553-8.
129. Chiba N, Murayama SY, Morozumi M, Nakayama E, Okada T, Iwata S, et al. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother.* 2009;15(2):92-8.
130. Jero J, Virolainen A, Salo P, Leinonen M, Eskola J, Karma P. PCR assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear of children with otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(2):288-92.
131. Salo P, Ortqvist A, Leinonen M. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J Infect Dis.* 1995;171(2):479-82.
132. Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O, Leinonen M, Mertsola J. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):633-7.

133. Frosch M, Müller D, Bousset K, Müller A. Conserved outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in capsule expression. *Infect Immun*. 1992;60(3):798-803.
134. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *J Exp Med*. 1931;53(4):471-92.
135. Pinto Junior VL, Rebelo MC, Gomes RN, Assis EF, Castro-Faria-Neto HC, Bóia MN. IL-6 and IL-8 in cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis and bacterial meningitis: their potential role as a marker for differential diagnosis. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):156-8.
136. Mukai AO, Krebs VL, Bertoli CJ, Okay TS. TNF-alpha and IL-6 in the diagnosis of bacterial and aseptic meningitis in children. *Pediatr Neurol*. 2006;34(1):25-9.
137. Vázquez JA, Adducci MeC, Coll C, Godoy Monzón D, Iserson KV. Acute meningitis prognosis using cerebrospinal fluid interleukin-6 levels. *J Emerg Med*. 2012;43(2):322-7.
138. Kleine TO, Zwerenz P, Zöfel P, Shiratori K. New and old diagnostic markers of meningitis in cerebrospinal fluid (CSF). *Brain Res Bull*. 2003;61(3):287-97.
139. Dulkerian SJ, Kilpatrick L, Costarino AT, McCawley L, Fein J, Corcoran L, et al. Cytokine elevations in infants with bacterial and aseptic meningitis. *J Pediatr*. 1995;126(6):872-6.
140. Tang RB, Lee BH, Chung RL, Chen SJ, Wong TT. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of children with bacterial meningitis. *Childs Nerv Syst*. 2001;17(8):453-6.
141. López-Cortés LF, Marquez-Arbizu R, Jimenez-Jimenez LM, Jimenez-Mejías E, Caballero-Granado FJ, Rey-Romero C, et al. Cerebrospinal fluid tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and interleukin-8 as diagnostic markers of cerebrospinal fluid infection in neurosurgical patients. *Crit Care Med*. 2000;28(1):215-9.
142. Bociąga-Jasik M, Garlicki A, Cieśla A, Kalinowska-Nowak A, Sobczyk-Krupiarz I, Mach T. The diagnostic value of cytokine and nitric oxide concentrations in cerebrospinal fluid for the differential diagnosis of meningitis. *Adv Med Sci*. 2012;57(1):142-7.
143. Nadal D, Leppert D, Frei K, Gallo P, Lamche H, Fontana A. Tumour necrosis factor-alpha in infectious meningitis. *Arch Dis Child*. 1989;64(9):1274-9.
144. Larysz-Brysz M, Lewin-Kowalik J, Czuba Z, Kotulska K, Olakowska E, Marcol W, et al. Interleukin-1 β increases release of endothelin-1 and tumor necrosis factor as well as reactive oxygen species by peripheral leukocytes during experimental subarachnoid hemorrhage. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(3):159-66.
145. Rao JS, Rapoport SI, Kim HW. Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain. *Transl Psychiatry*. 2011;1:e31.
146. Rao JS, Kim HW, Harry GJ, Rapoport SI, Reese EA. Increased neuroinflammatory and arachidonic acid cascade markers, and reduced synaptic proteins, in the postmortem frontal cortex from schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 2013.
147. Marcos MA, Vila J, Gratacos J, Brancos MA, Jimenez de Anta MT. Determination of D-lactate concentration for rapid diagnosis of bacterial infections of body fluids. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10(11):966-9.
148. Wellmer A, Prange J, Gerber J, Zysk G, Lange P, Michel U, et al. D- and L-lactate in rabbit and human bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(12):909-13.
149. Sakushima K, Hayashino Y, Kawaguchi T, Jackson JL, Fukuhara S. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid lactate for differentiating bacterial meningitis from aseptic meningitis: a meta-analysis. *J Infect*. 2011;62(4):255-62.
150. Prasad K, Sahu JK. Cerebrospinal fluid lactate: is it a reliable and valid marker to distinguish between acute bacterial meningitis and aseptic meningitis? *Crit Care*. 2011;15(1):104.
151. Huy NT, Thao NT, Diep DT, Kikuchi M, Zamora J, Hirayama K. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2010;14(6):R240.
152. Sáez-Llorens X, McCracken GH. Bacterial meningitis in children. *Lancet*. 2003;361(9375):2139-48.

153. Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T, van de Beek D. Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. *Lancet Neurol*. 2006;5(4):332-42.
154. Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain*. 2003;126(Pt 5):1015-25.
155. Østergaard C, Konradsen HB, Samuelsson S. Clinical presentation and prognostic factors of *Streptococcus pneumoniae* meningitis according to the focus of infection. *BMC Infect Dis*. 2005;5:93.
156. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(2):118-36.
157. van der Flier M, Geelen SP, Kimpen JL, Hoepelman IM, Tuomanen EI. Reprogramming the host response in bacterial meningitis: how best to improve outcome? *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):415-29.
158. Kato K, Yokoi T, Takano N, Kanegane H, Yachie A, Miyawaki T, et al. Detection by in situ hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. *J Immunol*. 1990;144(4):1317-22.
159. Fishman RA. Steroids in the treatment of brain edema. *N Engl J Med*. 1982;306(6):359-60.
160. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-42.
161. McIntyre PB, Berkey CS, King SM, Schaad UB, Kilpi T, Kanra GY, et al. Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis. A meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *JAMA*. 1997;278(11):925-31.
162. Lebel MH, Freij BJ, Syrogiannopoulos GA, Chrane DF, Hoyt MJ, Stewart SM, et al. Dexamethasone therapy for bacterial meningitis. Results of two double-blind, placebo-controlled trials. *N Engl J Med*. 1988;319(15):964-71.
163. Odio CM, Faingezicht I, Paris M, Nassar M, Baltodano A, Rogers J, et al. The beneficial effects of early dexamethasone administration in infants and children with bacterial meningitis. *N Engl J Med*. 1991;324(22):1525-31.
164. van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K. Steroids in adults with acute bacterial meningitis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):139-43.
165. van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(1):CD004405.
166. Arditi M, Mason EO, Bradley JS, Tan TQ, Barson WJ, Schutze GE, et al. Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics, and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. *Pediatrics*. 1998;102(5):1087-97.
167. Molyneux EM, Walsh AL, Forsyth H, Tembo M, Mwenechanya J, Kayira K, et al. Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9328):211-8.
168. McCracken GH. Rich nations, poor nations, and bacterial meningitis. *Lancet*. 2002;360(9328):183.
169. Girgis NI, Farid Z, Mikhail IA, Farrag I, Sultan Y, Kilpatrick ME. Dexamethasone treatment for bacterial meningitis in children and adults. *Pediatr Infect Dis J*. 1989;8(12):848-51.
170. Thomas R, Le Tulzo Y, Bouget J, Camus C, Michelet C, Le Corre P, et al. Trial of dexamethasone treatment for severe bacterial meningitis in adults. Adult Meningitis Steroid Group. *Intensive Care Med*. 1999;25(5):475-80.
171. Gijwani D, Kumhar MR, Singh VB, Chadda VS, Soni PK, Nayak KC, et al. Dexamethasone therapy for bacterial meningitis in adults: a double blind placebo control study. *Neurol India*. 2002;50(1):63-7.
172. Ahsan T, Shahid M, Mahmood T, Jabeen R, Jehangir U, Saleem M, et al. Role of dexamethasone in acute bacterial meningitis in adults. *J Pak Med Assoc*. 2002;52(6):233-9.
173. Coimbra RS, Loquet G, Leib SL. Limited efficacy of adjuvant therapy with dexamethasone in preventing hearing loss due to experimental pneumococcal meningitis in the infant rat. *Pediatr Res*. 2007;62(3):291-4.

174. Leib SL, Heimgartner C, Bifrare YD, Loeffler JM, Täuber MG. Dexamethasone aggravates hippocampal apoptosis and learning deficiency in pneumococcal meningitis in infant rats. *Pediatr Res.* 2003;54(3):353-7.
175. Leib SL, Clements JM, Lindberg RL, Heimgartner C, Loeffler JM, Pfister LA, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain.* 2001;124(Pt 9):1734-42.
176. Leib SL, Leppert D, Clements J, Täuber MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* 2000;68(2):615-20.
177. Yim CW, Flynn NM, Fitzgerald FT. Penetration of oral doxycycline into the cerebrospinal fluid of patients with latent or neurosyphilis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(2):347-8.
178. Brown DL, Desai KK, Vakili BA, Nouneh C, Lee HM, Golub LM. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):733-8.
179. Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;23(3):260-9.
180. Kastenbauer S, Koedel U, Pfister HW. Role of peroxynitrite as a mediator of pathophysiological alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis.* 1999;180(4):1164-70.
181. Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in the rat: evaluation of peroxynitrite scavengers for adjunctive therapy. *Eur J Pharmacol.* 2002;449(1-2):177-81.
182. Balfour HH. Acyclovir and other chemotherapy for herpes group viral infections. *Annu Rev Med.* 1984;35:279-91.
183. Long SS, Pool TE, Vodzak J, Daskalaki I, Gould JM. Herpes simplex virus infection in young infants during 2 decades of empiric acyclovir therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(7):556-61.
184. Najioullah F, Bosshard S, Thouvenot D, Boibieux A, Menager B, Biron F, et al. Diagnosis and surveillance of herpes simplex virus infection of the central nervous system. *J Med Virol.* 2000;61(4):468-73.
185. Abu Khattab M, Al Soub H, Al Maslamani M, Al Khuwaiter J, El Deeb Y. Herpes simplex virus type 2 (Mollaret's) meningitis: a case report. *Int J Infect Dis.* 2009;13(6):e476-9.
186. Corey L, Wald A. Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *N Engl J Med.* 2009;361(14):1376-85.
187. Ihekweaba UK, Kudesia G, McKendrick MW. Clinical features of viral meningitis in adults: significant differences in cerebrospinal fluid findings among herpes simplex virus, varicella zoster virus, and enterovirus infections. *Clin Infect Dis.* 2008;47(6):783-9.
188. Palzkill T. *Proteomics.* Springer ed2002.
189. Shi M, Caudle WM, Zhang J. Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiol Dis.* 2009;35(2):157-64.
190. Simonsen AH, McGuire J, Podust VN, Davies H, Minthon L, Skoog I, et al. Identification of a novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2008;29(7):961-8.
191. Ottervald J, Franzén B, Nilsson K, Andersson LI, Khademi M, Eriksson B, et al. Multiple sclerosis: Identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers. *J Proteomics.* 2010;73(6):1117-32.
192. Stoop MP, Singh V, Dekker LJ, Titulaer MK, Stingl C, Burgers PC, et al. Proteomics comparison of cerebrospinal fluid of relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One.* 2010;5(8):e12442.
193. Singh V, Hintzen RQ, Luider TM, Stoop MP. Proteomics technologies for biomarker discovery in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012;248(1-2):40-7.

194. da Costa AG, Gago MF, Garrett C. [Cerebrospinal fluid biomarkers for the early diagnosis of Parkinson's disease]. *Acta Med Port.* 2011;24 Suppl 4:761-8.
195. Savino R, Paduano S, Preianò M, Terracciano R. The proteomics big challenge for biomarkers and new drug-targets discovery. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):13926-48.
196. Alberts B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell.* 1998;92(3):291-4.
197. Jesse S, Steinacker P, Lehnert S, Sdzuj M, Cepek L, Tumani H, et al. A proteomic approach for the diagnosis of bacterial meningitis. *PLoS One.* 2010;5(4):e10079.
198. Duffy PE, Graf L, Huang YY, Rapport MM. Glial fibrillary acidic protein in ependymomas and other brain tumors. Distribution, diagnostic criteria, and relation to formation of processes. *J Neurol Sci.* 1979;40(2-3):133-46.
199. Goonetilleke UR, Scarborough M, Ward SA, Gordon SB. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in pneumococcal meningitis reveals potential biomarkers associated with survival. *J Infect Dis.* 2010;202(4):542-50.
200. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
201. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
202. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68(5):850-8.
203. Bairoch A, Bucher P. PROSITE: recent developments. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(17):3583-9.
204. Cokol M, Nair R, Rost B. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* 2000;1(5):411-5.
205. Nair R, Carter P, Rost B. NLSdb: database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):397-9.
206. Briesemeister S, Blum T, Brady S, Lam Y, Kohlbacher O, Shatkay H. SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins. *J Proteome Res.* 2009;8(11):5363-6.
207. Ekins S, Bugrim A, Brovold L, Kirillov E, Nikolsky Y, Rakhmatulin E, et al. Algorithms for network analysis in systems-ADME/Tox using the MetaCore and MetaDrug platforms. *Xenobiotica.* 2006;36(10-11):877-901.
208. White K, Ostrowski K, Maloney S, Norton R. The utility of cerebrospinal fluid parameters in the early microbiological assessment of meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):27-30.
209. Connolly KJ, Hammer SM. The acute aseptic meningitis syndrome. *Infect Dis Clin North Am.* 1990;4(4):599-622.
210. Greenlee JE. Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid evaluation. *Infect Dis Clin North Am.* 1990;4(4):583-98.
211. Sáez-Llorens X, McCracken GH. Bacterial meningitis in neonates and children. *Infect Dis Clin North Am.* 1990;4(4):623-44.
212. Wispelwey B, Tunkel AR, Scheld WM. Bacterial meningitis in adults. *Infect Dis Clin North Am.* 1990;4(4):645-59.
213. van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med.* 2006;354(1):44-53.
214. Yuan X, Desiderio DM. Proteomics analysis of human cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;815(1-2):179-89.
215. Chen YY, Lin SY, Yeh YY, Hsiao HH, Wu CY, Chen ST, et al. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis.* 2005;26(11):2117-27.
216. Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, et al. Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions. *Electrophoresis.* 2005;26(14):2843-9.
217. Parodi-Talice A, Durán R, Arrambide N, Prieto V, Piñeyro MD, Pritsch O, et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2004;34(8):881-6.

218. Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B, et al. Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med.* 2012.
219. Gundry RL, Fu Q, Jelinek CA, Van Eyk JE, Cotter RJ. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin Appl.* 2007;1(1):73-88.
220. Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life.* 2005;57(12):787-96.
221. Schumaker VN, Adams GH. Circulating lipoproteins. *Annu Rev Biochem.* 1969;38:113-36.
222. Saito K, Seishima M, Heyes MP, Song H, Fujigaki S, Maeda S, et al. Marked increases in concentrations of apolipoprotein in the cerebrospinal fluid of poliovirus-infected macaques: relations between apolipoprotein concentrations and severity of brain injury. *Biochem J.* 1997;321 (Pt 1):145-9.
223. Weiler-Güttler H, Sommerfeldt M, Papandrikopoulou A, Mischek U, Bonitz D, Frey A, et al. Synthesis of apolipoprotein A-1 in pig brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem.* 1990;54(2):444-50.
224. Möckel B, Zinke H, Flach R, Weiss B, Weiler-Güttler H, Gassen HG. Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium in vitro. *J Neurochem.* 1994;62(2):788-98.
225. Keeney JT, Swomley AM, Förster S, Harris JL, Sultana R, Butterfield DA. Apolipoprotein A-I: insights from redox proteomics for its role in neurodegeneration. *Proteomics Clin Appl.* 2013;7(1-2):109-22.
226. Nathan BR, Scheld WM. The potential roles of C-reactive protein and procalcitonin concentrations in the serum and cerebrospinal fluid in the diagnosis of bacterial meningitis. *Curr Clin Top Infect Dis.* 2002;22:155-65.
227. Dias Leite R, Alves Ribeiro M, Farhat CK. C-reactive Protein Follow-up of Children With Acute Bacterial Meningitis. *Braz J Infect Dis.* 1999;3(1):15-22.
228. Donald PR, Strachan AF, Schoeman JF, De Beer FC. Cerebrospinal fluid C-reactive protein in infective meningitis in childhood. *J Lab Clin Med.* 1985;106(4):424-7.
229. BenGershôm E, Briggeman-Mol GJ, de Zegher F. Cerebrospinal fluid C-reactive protein in meningitis: diagnostic value and pathophysiology. *Eur J Pediatr.* 1986;145(4):246-9.
230. Pemde HK, Harish K, Thawrani YP, Shrivastava S, Belapurkar KM. C-reactive protein in childhood meningitides. *Indian J Pediatr.* 1996;63(1):73-7.
231. Singh N, Arora S, Kahlon PS. Cerebrospinal fluid C-reactive protein in meningitis. *Indian Pediatr.* 1995;32(6):687-8.
232. Stahel PF, Nadal D, Pfister HW, Paradisis PM, Barnum SR. Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet.* 1997;349(9069):1886-7.
233. Goonetilleke UR, Scarborough M, Ward SA, Hussain S, Kadioglu A, Gordon SB. Death is associated with complement C3 depletion in cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis. *MBio.* 2012;3(2).
234. Janoff EN, Fasching C, Orenstein JM, Rubins JB, Opstad NL, Dalmaso AP. Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *J Clin Invest.* 1999;104(8):1139-47.
235. Rupprecht TA, Angele B, Klein M, Heesemann J, Pfister HW, Botto M, et al. Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *J Immunol.* 2007;178(3):1861-9.
236. Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology.* 1987;120(2):475-82.
237. Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M, Carretero OA. Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A.* 1984;6(10-11):1731-8.

238. Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreiras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(2):135-42.
239. McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(17):7724-8.
240. Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol.* 1949;156(2):261-73.
241. Boissonnas RA, Guttmann S, Jaquenoud PA, Konzett H, Stuermer E. Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia.* 1960;16:326.
242. Elliott DF, Horton EW, Lewis GP. Actions of pure bradykinin. *J Physiol.* 1960;153:473-80.
243. Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980;32(1):1-46.
244. Takano M, Horie M, Yayama K, Okamoto H. Lipopolysaccharide injection into the cerebral ventricle evokes kininogen induction in the rat brain. *Brain Res.* 2003;978(1-2):72-82.
245. Takano M, Satoh C, Kunitatsu N, Otani M, Hamada-Kanazawa M, Miyake M, et al. Lipopolysaccharide activates the kallikrein-kinin system in mouse choroid plexus cell line ECPC4. *Neurosci Lett.* 2008;434(3):310-4.
246. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology.* 1997;36(2-3):153-60.
247. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 1992;44(1):1-80.
248. Viel TA, Buck HS. Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease in vivo. *Curr Alzheimer Res.* 2011;8(1):59-66.
249. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation.* 2004;109(22):2698-704.
250. Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):695-705.
251. Weisfelt M, Determann RM, de Gans J, van der Ende A, Levi M, van de Beek D, et al. Procoagulant and fibrinolytic activity in cerebrospinal fluid from adults with bacterial meningitis. *J Infect.* 2007;54(6):545-50.
252. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-34.
253. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med.* 2002;30(5 Suppl):S294-301.
254. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76(2):301-14.
255. Weber JR, Angstwurm K, Bürger W, Einhäupl KM, Dirnagl U. Anti ICAM-1 (CD 54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol.* 1995;63(1):63-8.
256. Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(3):729-35.
257. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation.* 1997;95(10):2387-94.
258. Ozaki I, Zhang H, Mizuta T, Ide Y, Eguchi Y, Yasutake T, et al. Menatetrenone, a vitamin K2 analogue, inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by suppressing cyclin D1 expression through inhibition of nuclear factor kappaB activation. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2236-45.
259. Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, et al. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2002;62(17):4854-9.

260. Mizuta T, Ozaki I, Eguchi Y, Yasutake T, Kawazoe S, Fujimoto K, et al. The effect of menatetrenone, a vitamin K2 analog, on disease recurrence and survival in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment: a pilot study. *Cancer*. 2006;106(4):867-72.
261. Askari F, Innis D, Dick RB, Hou G, Marrero J, Greenson J, et al. Treatment of primary biliary cirrhosis with tetrathiomolybdate: results of a double-blind trial. *Transl Res*. 2010;155(3):123-30.
262. Henry NL, Dunn R, Merjaver S, Pan Q, Pienta KJ, Brewer G, et al. Phase II trial of copper depletion with tetrathiomolybdate as an antiangiogenesis strategy in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Oncology*. 2006;71(3-4):168-75.
263. Tallaksen-Greene SJ, Janiszewska A, Benton K, Hou G, Dick R, Brewer GJ, et al. Evaluation of tetrathiomolybdate in the R6/2 model of Huntington disease. *Neurosci Lett*. 2009;452(1):60-2.
264. Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, et al. Conversion of phyloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11270-9.
265. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, et al. Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci*. 2003;23(13):5816-26.
266. Brewer GJ, Askari F, Dick RB, Sitterly J, Fink JK, Carlson M, et al. Treatment of Wilson's disease with tetrathiomolybdate: V. Control of free copper by tetrathiomolybdate and a comparison with trientine. *Transl Res*. 2009;154(2):70-7.
267. Kaneider NC, Förster E, Mosheimer B, Sturn DH, Wiedermann CJ. Syndecan-4-dependent signaling in the inhibition of endotoxin-induced endothelial adherence of neutrophils by antithrombin. *Thromb Haemost*. 2003;90(6):1150-7.
268. Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*. 1987;235(4794):1348-52.
269. Eckle I, Seitz R, Egbring R, Kolb G, Havemann K. Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1991;372(11):1007-13.
270. Mesters RM, Helterbrand J, Utterback BG, Yan B, Chao YB, Fernandez JA, et al. Prognostic value of protein C concentrations in neutropenic patients at high risk of severe septic complications. *Crit Care Med*. 2000;28(7):2209-16.
271. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*. 2001;345(6):408-16.
272. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wün TC, Taylor FB, Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2850-60.
273. van der Poll T, Levi M, Büller HR, van Deventer SJ, de Boer JP, Hack CE, et al. Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *J Exp Med*. 1991;174(3):729-32.
274. Dugan L, Choi D. Hypoxia-Ischemia and Brain infarction. *Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 1999.
275. Bartholdi D, Rubin BP, Schwab ME. VEGF mRNA induction correlates with changes in the vascular architecture upon spinal cord damage in the rat. *Eur J Neurosci*. 1997;9(12):2549-60.
276. Sköld M, Cullheim S, Hammarberg H, Piehl F, Suneson A, Lake S, et al. Induction of VEGF and VEGF receptors in the spinal cord after mechanical spinal injury and prostaglandin administration. *Eur J Neurosci*. 2000;12(10):3675-86.
277. Marti H. Vascular Endothelial Growth Factor. 2000.
278. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300):661-5.
279. Morrison R, Kinoshita Y, Johnson M. Neuronal Survival and Cell Death Signaling Pathways. 2000.
280. Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, et al. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5256-64.
281. Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh TC, Millhorn DE. Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cell Signal*. 2001;13(1):23-7.

282. Yin H, Chao L, Chao J. Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad.14-3-3 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2005;280(9):8022-30.
283. Xia CF, Yin H, Borlongan CV, Chao L, Chao J. Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. *Hypertension*. 2004;43(2):452-9.
284. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*. 2005;6(8):777-84.
285. Hers I, Tavaré JM, Denton RM. The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. *FEBS Lett*. 1999;460(3):433-6.
286. Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, et al. 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(5):635-9.
287. Leost M, Schultz C, Link A, Wu YZ, Biernat J, Mandelkow EM, et al. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur J Biochem*. 2000;267(19):5983-94.
288. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem*. 2001;276(1):251-60.
289. Martinez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, Moreno FJ. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem*. 2002;45(6):1292-9.
290. Leib SL, Täuber MG. Pathogenesis of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am*. 1999;13(3):527-48, v-vi.
291. Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*. 2012;14(4):460-6.
292. Fassbender K, Ries S, Schminke U, Schneider S, Hennerici M. Inflammatory cytokines in CSF in bacterial meningitis: association with altered blood flow velocities in basal cerebral arteries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;61(1):57-61.
293. Sprenger H, Rösler A, Tonn P, Braune HJ, Huffmann G, Gemsa D. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;80(2):155-61.
294. Klein M, Koedel U, Pfeifferkorn T, Zeller G, Woehrl B, Pfister HW. Arterial cerebrovascular complications in 94 adults with acute bacterial meningitis. *Crit Care*. 2011;15(6):R281.
295. Keller TT, Mairuhu AT, de Kruif MD, Klein SK, Gerdes VE, ten Cate H, et al. Infections and endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1):40-8.
296. Ries S, Schminke U, Fassbender K, Daffertshofer M, Steinke W, Hennerici M. Cerebrovascular involvement in the acute phase of bacterial meningitis. *J Neurol*. 1997;244(1):51-5.
297. Pathan N, Faust SN, Levin M. Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch Dis Child*. 2003;88(7):601-7.
298. Alan S, Yıldız D, Erdevi O, Atasay B, Nar Ogtun S, Ince E, et al. [An Early Neonatal Sepsis Case Due to *Streptococcus pneumoniae* Serotype 7F]. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(1):158-63.
299. Charalambous BM, Leung MH. Pneumococcal sepsis and nasopharyngeal carriage. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(3):222-7.
300. Osterud B, Rao LV, Olsen JO. Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb Haemost*. 2000;83(6):861-7.
301. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med*. 1994;179(4):1253-9.

302. Paul R, Koedel U, Winkler F, Kieseier BC, Fontana A, Kopf M, et al. Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain*. 2003;126(Pt 8):1873-82.
303. Saija A, Princi P, Lanza M, Scalese M, Aramnejad E, De Sarro A. Systemic cytokine administration can affect blood-brain barrier permeability in the rat. *Life Sci*. 1995;56(10):775-84.
304. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*. 1996;64(1):37-43.
305. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med*. 1996;44(8):474-82.
306. Koedel U, Bernatowicz A, Frei K, Fontana A, Pfister HW. Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol*. 1996;157(11):5185-91.
307. Houssiau FA, Bukasa K, Sindic CJ, Van Damme J, Van Snick J. Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin Exp Immunol*. 1988;71(2):320-3.
308. Puchalski T, Prabhakar U, Jiao Q, Berns B, Davis HM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of an anti-interleukin-6 chimeric monoclonal antibody (siltuximab) in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1652-61.
309. Guo Y, Nemeth J, O'Brien C, Susa M, Liu X, Zhang Z, et al. Effects of siltuximab on the IL-6-induced signaling pathway in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5759-69.
310. Kurzrock R, Voorhees PM, Casper C, Furman RR, Fayad L, Lonial S, et al. A Phase I, Open-Label Study of Siltuximab, an Anti-IL-6 Monoclonal Antibody, in Patients with B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma, Multiple Myeloma, or Castleman's Disease. *Clin Cancer Res*. 2013.
311. Bergamaschini L, Donarini C, Gobbo G, Parnetti L, Gallai V. Activation of complement and contact system in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(16):1971-83.
312. Shcherbakova I, Neshkova E, Dotsenko V, Platonova T, Shcherbakova E, Yarovaya G. The possible role of plasma kallikrein-kinin system and leukocyte elastase in pathogenesis of schizophrenia. *Immunopharmacology*. 1999;43(2-3):273-9.
313. Dellalibera-Joviliano R, Dos Reis ML, Cunha FeQ, Donadi EA. Kinins and cytokines in plasma and cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *J Rheumatol*. 2003;30(3):485-92.
314. Frick IM, Björck L, Herwald H. The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb Haemost*. 2007;98(3):497-502.
315. Frick IM, Akesson P, Herwald H, Mörgelin M, Malmsten M, Nägler DK, et al. The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J*. 2006;25(23):5569-78.
316. Oehmcke S, Herwald H. Contact system activation in severe infectious diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(2):121-6.
317. Pixley RA, Zellis S, Bankes P, DeLa Cadena RA, Page JD, Scott CF, et al. Prognostic value of assessing contact system activation and factor V in systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 1995;23(1):41-51.
318. Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem*. 1985;260(14):8610-7.
319. Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, et al. Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol*. 2002;2(13-14):1729-39.
320. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*. 2005;57(1):27-77.

321. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Walther T, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):8140-5.
322. Wotherspoon G, Winter J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett*. 2000;294(3):175-8.
323. Ma QP, Heavens R. Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport*. 2001;12(11):2311-4.
324. Shughrue PJ, Ky B, Austin CP. Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 2003;465(3):372-84.
325. Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*. 2010;44(2):145-54.
326. Predescu D, Predescu S, Shimizu J, Miyawaki-Shimizu K, Malik AB. Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(3):L371-81.
327. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13176-81.
328. Brovkovich V, Zhang Y, Brovkovich S, Minshall RD, Skidgel RA. A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med*. 2011;15(2):258-69.
329. Zhang Y, Brovkovich V, Brovkovich S, Tan F, Lee BS, Sharma T, et al. Dynamic receptor-dependent activation of inducible nitric-oxide synthase by ERK-mediated phosphorylation of Ser745. *J Biol Chem*. 2007;282(44):32453-61.
330. Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):509-20.
331. Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(12):646-51.
332. Pesquero JB, Bader M. Genetically altered animal models in the kallikrein-kinin system. *Biol Chem*. 2006;387(2):119-26.
333. Merino VF, Todiras M, Campos LA, Saul V, Popova E, Baltatu OC, et al. Increased susceptibility to endotoxic shock in transgenic rats with endothelial overexpression of kinin B(1) receptors. *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(7):791-8.
334. Imamura T, Tanase S, Szmyd G, Kozik A, Travis J, Potempa J. Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med*. 2005;201(10):1669-76.
335. Herwald H, Collin M, Müller-Esterl W, Björck L. Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. *J Exp Med*. 1996;184(2):665-73.
336. Molla A, Yamamoto T, Akaike T, Miyoshi S, Maeda H. Activation of hageman factor and prekallikrein and generation of kinin by various microbial proteinases. *J Biol Chem*. 1989;264(18):10589-94.
337. Pace D, Pollard AJ. Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 2:B3-9.
338. Kirsch EA, Barton RP, Kitchen L, Giroir BP. Pathophysiology, treatment and outcome of meningococemia: a review and recent experience. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15(11):967-78; quiz 79.
339. Raidoo DM, Bhoola KD. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther*. 1998;79(2):105-27.
340. Mayhan WG. Regulation of blood-brain barrier permeability. *Microcirculation*. 2001;8(2):89-104.
341. Lewis RE, Childers SR, Phillips MI. [125I]Tyr-bradykinin binding in primary rat brain cultures. *Brain Res*. 1985;346(2):263-72.

342. Cholewinski AJ, Stevens G, McDermott AM, Wilkin GP. Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J Neurochem*. 1991;57(4):1456-8.
343. Kozlowski MR, Rosser MP, Hall E. Identification of 3H-bradykinin binding sites in PC-12 cells and brain. *Neuropeptides*. 1988;12(4):207-11.
344. Fujiwara Y, Mantione CR, Yamamura HI. Identification of B2 bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol*. 1988;147(3):487-8.
345. Sharif NA, Whiting RL. Identification of B(2)-bradykinin receptors in guinea pig brain regions, spinal cord and peripheral tissues. *Neurochem Int*. 1991;18(1):89-96.
346. Chai KX, Ni A, Wang D, Ward DC, Chao J, Chao L. Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics*. 1996;31(1):51-7.
347. Göbel K, Pankratz S, Schneider-Hohendorf T, Bittner S, Schuhmann MK, Langer HF, et al. Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking. *J Autoimmun*. 2011;36(2):106-14.
348. Martins AH, Alves JM, Perez D, Carrasco M, Torres-Rivera W, Eterović VA, et al. Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists. *PLoS One*. 2012;7(2):e30755.
349. Xia CF, Smith RS, Shen B, Yang ZR, Borlongan CV, Chao L, et al. Postischemic brain injury is exacerbated in mice lacking the kinin B2 receptor. *Hypertension*. 2006;47(4):752-61.
350. Xia CF, Yin H, Yao YY, Borlongan CV, Chao L, Chao J. Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. *Hum Gene Ther*. 2006;17(2):206-19.
351. Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB, Brede M, Bader M, Stoll G, et al. Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke*. 2009;40(1):285-93.
352. Kayashima Y, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system and oxidative stress. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(1):92-6.
353. Goetghebuer T, West TE, Wermenbol V, Cadbury AL, Milligan P, Lloyd-Evans N, et al. Outcome of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b in children in The Gambia. *Trop Med Int Health*. 2000;5(3):207-13.
354. Savard M, Labonté J, Dubuc C, Neugebauer W, D'Orléans-Juste P, Gobeil F. Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. *Biol Chem*. 2013;394(3):353-60.
355. Fincham CI, Bressan A, Paris M, Rossi C, Fattori D. Bradykinin receptor antagonists--a review of the patent literature 2005-2008. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(7):919-41.
356. Lacoste B, Tong XK, Lahjouji K, Couture R, Hamel E. Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation*. 2013;10(1):57.