

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora,

o texto completo desta

DISSERTAÇÃO

será

disponibilizado somente a partir

de

01/06/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE

**Expressão de microRNAs no hipocampo de ratos
submetidos a meningite pneumocócica e tratados com
vitamina B12**

Araçatuba
2019

NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE

**Expressão de microRNAs no hipocampo de ratos
submetidos a meningite pneumocócica e tratados com
vitamina B12**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

Orientadora: Pesquisadora Flávia Lombardi Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Roney Santos Coimbra

Araçatuba

2019

S285e Scaramele, Natália Francisco
Expressão de microRNAs no hipocampo de ratos submetidos a meningite pneumocócica e tratados com vitamina B12 / Natália Francisco Scaramele. -- Araçatuba, 2019
65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Flávia Lombardi Lopes
Coorientador: Roney Santos Coimbra

1. Meningite. 2. MicroRNAs. 3. Vitamina B12. 4. Hipocampo.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Expressão de microRNAs no hipocampo de ratos submetidos a meningite
pneumocócica e tratados com vitamina B12

AUTORA: NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE

ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

COORIENTADOR: RONEY SANTOS COIMBRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI

Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UniSALESIANO de Araçatuba

Araçatuba, 31 de maio de 2019.

Aos meus pais, por todo suporte e incentivo desde sempre.

A meu esposo, que me mantém forte nos propósitos da minha vida, quando me faltam forças.

E a todos aqueles aos quais poderei ajudar por intermédio deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre incentivaram meus estudos. Minha mãe que se esforçou, com trabalho e suor para que eu pudesse seguir na academia. E à memória de meu pai, pelas palavras, ditas em vida e que sempre ressoam em minha mente: "Estude, pois o conhecimento é a única coisa que ninguém é capaz de tirar de você".

Ao amor da minha vida, Guilherme Bruno da Silva, que durante esta jornada foi meu namorado, noivo e esposo. Mas que além destes rótulos foi minha fortaleza, e luz para meus dias sombrios. Obrigada pelo apoio, pelas broncas e por dividir essa jornada de vida comigo.

As amigas que a faculdade e a ciência me deram: Daniela, Juliana, Maria Fernanda, Maria Sara, Mariana, Nayra, Thaís. Obrigada pelos conselhos, conversas, alegrias e tristezas compartilhadas.

A todos os colegas que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

A minha orientadora, Flávia Lombardi Lopes, que me deu oportunidade de realizar o mestrado no melhor laboratório que existe (EpiLab), pela confiança, e companheirismo construídos ao longo destes anos. Não existem palavras que possam expressar minha gratidão.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA (Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba) pela oportunidade de realização do mestrado. A todos os funcionários e colaboradores, sempre solícitos e dispostos.

As professoras participantes da banca do meu Exame Geral de Qualificação e da Defesa, Profa. Valéria Lima, Profa. Gisele Machado e Profa. Eliane Cervelatti, pelas valiosas contribuições, que ajudaram a enriquecer este trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado no início do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado, processo: 2017/17783-9.

Ao coorientador deste trabalho, Dr. Roney Santos Coimbra e ao Instituto René Rachou (FioCruz Minas), pela parceria e parte do financiamento.

SCARAMELE, N. F. **Expressão de microRNAs no hipocampo de ratos submetidos a meningite pneumocócica e tratados com vitamina B12.** 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

A meningite se caracteriza pela inflamação da aracnóide, pia-máter e líquido; causando danos às estruturas corticais e subcorticais. As meningites bacterianas estão intimamente relacionadas ao nível de desenvolvimento socioeconômico do país e são consideradas endêmicas no Brasil. Apesar dos esforços para o desenvolvimento de medicamentos e vacinas, a doença ainda possui altos índices de morbidade. Ela ocorre quando bactérias atravessam barreiras de proteção do corpo e alcançam o sistema nervoso central, desencadeando uma resposta imunológica. Sabe-se que durante o curso da doença os níveis de homocisteína do líquido aumentam, promovendo desmielinização e danos neuronais, e que a vitamina B12 é um tratamento utilizado para diminuir danos. Os microRNAs (miRNAs) são instrumentos de resposta fisiológica, tendo sua expressão modificada em diferentes tecidos, em decorrência de diferentes estímulos fisiológicos e patológicos. Estão associados ao controle da expressão de diferentes mediadores inflamatórios e sua ausência é capaz de causar danos severos a resposta imune. Considerando a importância dos miRNAs para regulação de processos imunes o presente estudo visou elucidar os padrões de expressão dos miRNAs durante o processo inflamatório da meningite pneumocócica (MP), bem como observar esses padrões em resposta ao tratamento adjuvante da doença com vitamina B12. Observamos um total de 37 miRNAs diferencialmente expressos, a infecção regulou positivamente 22 deles, e outros 7 negativamente, o tratamento adjuvante com vitamina B12 em animais não-infectados aumentou a expressão de 2, e diminuiu a expressão de 1 miRNA; o tratamento adjuvante com vitamina B12 em animais infectados aumentou a expressão de 2 e diminuiu a de 6 miRNAs. Vias de sinalização, intimamente relacionadas à meningite pneumocócica foram encontradas reguladas, tanto pela MP, quanto pelo tratamento adjuvante com vitamina B12 em animais infectados. O uso da vitamina B12 não regulou nenhuma via em animais não infectados. Pode-se concluir que o presente estudo corrobora com achados recorrentes durante as meningites bacterianas, e serviu de início para a investigação dos efeitos da terapia adjuvante com vitamina B12 durante a MP, entretanto são necessários estudos futuros sobre os miRNAs regulados durante o tratamento adjuvante e seus alvos experimentais.

Palavras-chave: Meningite. MicroRNAs. Vitamina B12. Hipocampo. Epigenômica.

SCARAMELE, N. F. **Hippocampal expression of microRNAs in rats with pneumococcal meningitis treated with vitamin B12.** 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Meningitis is characterized by an arachnoid, pia mater and cerebrospinal fluid inflammation; causing damage to the cortical and subcortical structures. Bacterial meningitis is closely related to the level of socioeconomic development of country and is considered endemic in Brazil. Despite efforts to develop drugs and vaccines, the disease still has high rates of morbidity and mortality. Occurring when bacteria cross body protection barriers and reach the central nervous system, triggering immune response. It is known that during disease course the the levels of homocysteine increase in cerebrospinal fluid, leading to demyelination and neuronal damage, and that vitamin B12 is a treatment used to reduce those damages. MicroRNAs (miRNAs) are instruments of physiological response, having their expression modified in different tissues, due to different physiological and pathological stimuli. They are associated with expression control of different inflammatory mediators and their absence is capable of causing severe damage to the immune response. Considering the importance of miRNAs in regulation of immune processes, the present study aimed to elucidate miRNA expression patterns during the inflammatory process resulting from pneumococcal meningitis (PM), and to observe these patterns in response to adjuvant treatment of vitamin B12 in infected rats. We observed a total of 37 differentially expressed miRNAs; the infection positively regulated 22 and negatively regulated 7 of them, while the adjuvant treatment with vitamin B12 in non-infected animals increased the expression of 2, and decreased the expression of 1 miRNA; the adjuvant treatment with vitamin B12 in infected animals upregulated 2 and downregulated 6 miRNAs. Signaling pathways, closely related to PM, were found to be regulated by both, PM and adjuvant treatment with vitamin B12 in infected animals. The adjuvant therapy with vitamin B12 did not regulate any pathways in non-infected rats. We can concluded that, the present study corroborates with recurrent findings during bacterial meningitis course, and served as a start for the investigation of vitamin B12 adjuvant therapy effects during PM. However, future studies about the adjuvant treatment regulated miRNAs, and their experimental targets are needed.

Keywords: Meningitis. MicroRNAs. Vitamin B12. Hippocampus. Epigenomics.

APÊNDICE A – Referências da Introdução Geral

1. Gonçalves e Silva HC, Mezarobba N. Meningite no Brasil em 2015: o panorama da atualidade. *Arq Catarin Med.* 2018;47(1):34–46.
2. Ministério da Saúde (BR). Perfil Epidemiológico da Meningite: Brasil & Mundo. Porto Alegre; 2015.
3. Saha S, Sharma JD, Chowdrury MA, Alauddin M. Change of protein content in cerebro-spinal fluid (CSF) with the different types of meningitis. *Int J Cur Res Rev.* 2016;8(18):16–20.
4. Meli DN, Christen S, Leib SL, Taüber MG. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15(3):253–257.
5. Coimbra RS, Voisin V, de Saizieu AB, Lindberg RLP, Wittwer M, Leppert D, et al. Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. *BMC Biol.* 2006;2:4–15.
6. Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(12):721–736.
7. Hoen B, Viel JF, Gérard A, Dureux JB, Canton P. Mortality in pneumococcal meningitis : a multivariate analysis of prognostic factors. *Eur J Med.* 1993;2(1): 28–32.
8. Camargo DRA. Método, software e banco de dados para sorotipagem molecular de *Streptococcus pneumoniae* visando o monitoramento da eficácia do programa de vacinação no Brasil [dissertação]. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou; 2014.
9. Levinson W. Microbiologia médica e imunologia. 13 ed. Porto Alegre: Ed AMGH; 2016.

10. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):355–367.
11. Daniels CC, Rogers PD, Shelton CM. A review of pneumococcal vaccines: current polysaccharide vaccine recommendations and future protein antigens. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2016;21(1):27–35.
12. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw MH. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(5): e0177113.
13. Generoso JS. Tratamento com vitamina b6 e b9 na prevenção de dano oxidativo e cognitivo em meningite pneumocócica experimental [tese]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2017.
14. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, et al. Bacterial Meningitis in the United States in 1995: active surveillance team. *N Engl J Med*. 1997;337(14):970–976.
15. Shin SH, Kim KS. Treatment of bacterial meningitis: an update. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13(15):2189–2206.
16. Klein M, Höhne C, Angele B, Högen T, Pfister HW, Tüfekci H, et al. Adjuvant non-bacteriolytic and anti-inflammatory combination therapy in pneumococcal meningitis: an investigation in a mouse model. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):108.e9-108.e15.
17. McGill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T. Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet*. 2016;388(10063):3036–3047.
18. Ben-Shimol S, Givon-Lavi N, Greenberg D, Stein M, Megged O, Bar-Yochai A, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccines introduction on antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* meningitis in children aged 5 years or

- younger, Israel, 2004 to 2016. *Euro Surveill.* 2018;23(47):1800081.
19. Andersson B, Dahmén J, Frejd T, Leffler H, Magnusson G, Noori G, et al. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med.* 1983;158(2):559–570.
 20. Idänpään-Heikkilä I, Simon PM, Zopf D, Vullo T, Cahill P, Sokol K, et al. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis.* 1997;176(3):704–712.
 21. 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):557–591.
 22. Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, et al. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell.* 2000;102(6):827–837.
 23. Kaetzel CS. Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? *Curr Biol.* 2001;11(1):R35–R38.
 24. Li S, Kelly SJ, Lamani E, Ferraroni M, Jedrzejewski MJ. Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *EMBO J.* 2000;19(6):1228–1240.
 25. Alcantara RB, Preheim LC, Gentry-Nielsen MJ. Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 2001;69(6):3569–3575.
 26. Del Bigio MR. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia.* 1995;14(1):1–13.
 27. Quagliarello VJ, Long WJ, Scheld WM. Morphologic alterations of the blood-

- brain barrier with experimental meningitis in the rat: temporal sequence and role of encapsulation. *J Clin Invest.* 1986;77(4):1084–1095.
28. Rojas H, Ritter C, Pizzol FD. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(2):222–227.
 29. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002;200(6):629–638.
 30. Iovino F, Brouwer MC, van de Beek D, Molema G, Bijlsma JJE. Signalling or binding: the role of the platelet-activating factor receptor in invasive pneumococcal disease. *Cell Microbiol.* 2013;15(6):870–881.
 31. Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(2):195–201.
 32. Coimbra RS, Calegare BFA, Candiani TMS, D'Almeida V. A putative role for homocysteine in the pathophysiology of acute bacterial meningitis in children. *BMC Clin Pathol.* 2014;14(1):43.
 33. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu P V, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(11):5923–5928.
 34. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40(5):311–320.
 35. Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum VJ, et al. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *J Bras Patol Med Lab.* 2005;41(5):323–334.
 36. Martins JT, Carvalho-Silva M, Streck EL. Efeitos da deficiência de vitamina b12

- no cérebro. Rev Inova Saúde. 2017;6(1):192–206.
37. Busslinger M, Tarakhovsky A. Epigenetic control of immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(6):a019307.
 38. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nat . 2004;431(7006):350–355.
 39. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281–97.
 40. Costa EBO, Pacheco C. MicroRNAs: current perspectives of gene expression regulation in eukaryotes. Biosaúde. 2012;14(2):81–93.
 41. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science. 2001;294(5543):862–864.
 42. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(12):1097–1101.
 43. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. 2010;11(9):597–610.
 44. Avnit-Sagi T, Kantorovich L, Kredon-Russo S, Hornstein E, Walker MD. The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. PLoS One. 2009;4(4):e5033.
 45. Chable-Bessia C, Meziane O, Latreille D, Triboulet R, Zamborlini A, Wagschal A, et al. Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. Retrovirology. 2009;6:26.
 46. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. EMBO J. 2005;24(1):138–148.

47. Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular Basis for Target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*. 2007;130(1):101–112.
48. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293–296.
49. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(11):4034–4039.
50. O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(5):1604–1609.
51. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren M V., Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608–611.