

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR**

ROSEANE BORNER DE OLIVEIRA

**Neurodegeneração Crônica em Modelo Murino: Ensaio
Comportamentais e Neuropatológicos na Doença PRION na
fêmea adulta do Camundongo da Variedade Suíça Albina**

**BELÉM-PA
2009**

ROSEANE BORNER DE OLIVEIRA

**Neurodegeneração Crônica em Modelo Murino: Ensaio
Comportamentais e Neuropatológicos na Doença PRION na
fêmea adulta do Camundongo da Variedade Suíça Albina**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como Requisito Parcial para a Obtenção do Grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz

**BELÉM-PA
2009**

ROSEANE BORNER DE OLIVEIRA

**Neurodegeneração Crônica em Modelo Murino: Ensaio
Comportamentais e Neuropatológicos na Doença PRION na
fêmea adulta do Camundongo da Variedade Suíça Albina**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como Requisito Parcial para a Obtenção do Grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Data da aprovação:

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Márcia Consentino Kronka Sosthenes
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. Pedro Fernando Vasconcelos
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Prof^a. Dr. Rubem Carlos de Araújo Guedes
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Dedico este trabalho científico:

Para os meus filhos e a minha família que sempre estiveram comigo nas horas mais difíceis, sustentando-me como verdadeiros pilares.

Aos meus amigos que sempre estavam dispostos a escutar e ajudar.

Aos meus colegas de trabalho pela troca de experiência e convivência.

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos que de uma forma direta e indireta tiveram algum papel na elaboração deste trabalho. Gostaria de agradecer a grande oportunidade oferecida pelo Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço-Diniz, e do seu grupo de trabalho do laboratório de neurodegeneração e infecção, das quais sempre pude contar com o apoio de meus colegas e amigos, João Bento Torres, Juliana Paes, Renata Reis, Carlos Santos Filho, João Paulo Coimbra, Solimar Cardoso e Zaire Alves. Em especial, meu agradecimento para meus orientados Daniele Sadala e Diego Raoni que demonstraram durante o desenvolvimento do trabalho, dedicação, companheirismo, amizade além de muita competência.

Ao Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz do Instituto Evandro Chagas, pelas oportunidades dadas em nos permitir estender nossas pesquisas.

A meus filhos pela compreensão de tantos momentos ausentes.

A meus pais, irmãos e cunhados por terem acreditado, cujo apoio foi fundamental para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE QUADROS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
1	INTRODUÇÃO
1.1	EXPANSÃO DA POPULAÇÃO IDOSA NO BRASIL E NO MUNDO E O CUSTO SOCIAL DO ENVELHECIMENTO.....
1.2	ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL EM CÉREBROS NORMAIS.....
1.3	ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL ALTERADA PELA NEURODEGENERAÇÃO CRÔNICA EM MODELO MURINO DE DOENÇA PRION E NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....
1.4	ESTIMATIVAS NUMÉRICAS SEM VIÉS: UM CAPÍTULO RECENTE DA NEUROMORFOLOGIA QUANTITATIVA.....
1.4.1	O fracionador óptico em ação
1.4.2	Identificação dos objetos e das áreas de interesse no cérebro normal e alterado: imunohistoquímicas, histoquímicas seletivas e injeção de traçadores
1.5	O MODELO EXPERIMENTAL.....
2	OBJETIVOS
2.1	OBJETIVO GERAL.....
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....
3	MATERIAIS E MÉTODOS
3.1	ANIMAIS, ANESTESIA E INOCULAÇÃO DOS HOMOGENADOS CEREBRAIS.....
3.2	ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....
3.2.1	Remoção e estocagem de comida
3.2.2	Atividade de campo aberto
3.2.3	Pontes de bastão
3.3	IDENTIFICAÇÃO INAMBÍGUA DAS ÁREAS E OBJETOS DE INTERESSE: ENSAIOS HODOLÓGICOS, ARQUITETÔNICOS, HISTOQUÍMICA SELETIVA E IMUNOMARCAÇÃO.....
3.3.1	Injeção e revelação do neurotraçador
3.3.2	Sacrifício, fixação e corte
3.3.3	Imunohistoquímica seletiva para neurônios

3.3.4	Imunohistoquímica para GFAP.....
3.3.5	Histoquímica para revelação da microglia ativada.....
3.3.6	Histoquímica para detecção da rede perineuronal.....
3.3.7	Imunohistoquímica seletiva para PrP ^{SC}
3.3.8	Contracoloração de Nissl.....
3.3.9	Avaliação quantitativa de neurônios, astrócitos, microglias e redes perineurais.....
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....
4	RESULTADOS
4.1	CARACTERIZAÇÃO HODOLÓGICA E ARQUITETÔNICA DO HIPOCAMPO E DO GIRO DENTEADO E ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS DO GIRO DENTEADO.....
4.2	ACHADOS NEUROPATOLÓGICOS.....
4.2.1	Análise Qualitativa
4.2.1.1	Microglia Ativada e Astrócitos Reativos
4.2.1.2	Redes Perineuronais
4.2.1.3	Terminais Axonais
4.2.1.4	Vacuolização e Depósitos Amilóides : PrP^{SC} e Pr^{PC}
4.2.2	Análises Quantitativas Pelo Fracionador Óptico
4.2.2.1	Microglias ativadas
4.2.2.2	Redes perineuronais
4.2.2.3	Astrócitos
4.2.2.4	Neurônios
4.3	ACHADOS COMPORTAMENTAIS NOS CAMUNDONGOS C57BL/6j E ALBINO SUIÇO: REMOÇÃO E ESTOCAGEM DE COMIDA, CAMPO ABERTO (OPEN FIELD) E PONTE DE BASTÕES.....
5	DISCUSSÃO
5.1	ANÁLISE COMPARATIVA DA EVOLUÇÃO DA DOENÇA PRION NOS MODELOS MURINOS C57BI6J E ALBINO SUÍÇO
5.1.1	Ensaio Comportamentais
5.1.2	Achados Neuropatológicos
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS E DOS OBJETOS DE INTERESSE PARA ESTIMATIVAS QUANTITATIVAS SEM VIÉS
5.3	CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS
5.3.1	Acerca do Neurotraçador
5.3.2	Acerca de Distorções no Eixo Z em Secções Obtidas com Vibrátomo
5.3.3	Os Limites das Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico
6	Conclusão
	REFERÊNCIAS
	ANEXO

RESUMO

No presente trabalho implantou-se como modelo experimental para estudos de neurodegeneração crônica a doença prion induzida pelo agente ME7 em fêmea adulta do camundongo Suíço albino. As alterações comportamentais e neuropatológicas seguem de perto as previamente descritas para o camundongo C57BL/6j com duas exceções: 1) o septum ao invés do hipocampo é a região onde se detectou mais precocemente o maior número de microglias ativadas e astrócitos reativos e onde houve a maior redução de redes perineuronais nos estágios iniciais da doença; 2) Em relação ao C57BL/6j o curso temporal da doença é em média 4 semanas mais longo (26 semanas) e os sintomas iniciais começam a aparecer 4 semanas mais tarde (16 semanas) na variedade Suíça albina. Semelhante ao encontrado no C57BL/6j não se encontrou diferença nas estimativas do número de neurônios nos animais inoculados com o agente ME7 em relação aos inoculados com homogenado cerebral normal 15 e 18 semanas após a inoculação. A análise comparada do número de microglias ativadas astrócitos reativos e redes perineuronais empregando o fracionador óptico revelou diferenças significativas nos animais sacrificados na 15^a em relação aos sacrificados na 18^a semana pós-inoculação, com aumento do número das primeiras e redução do número das últimas na 18^a semana (teste T, bi-caudal $p < 0.05$). A análise de cluster seguida da análise discriminante dos resultados dos testes comportamentais da variedade Suíça albina aplicada a cada quinzena ao longo do curso temporal da doença, revelou que a remoção de comida é a única variável discriminante para detecção de dois grupos distintos: um grupo menor (em torno de 40%, $n=4$), mais sensível, onde a doença cursa mais rápido e os animais atingem a fase terminal em 22 semanas, e outro maior (em torno de 60%, $n=6$), menos sensível, onde os animais atingem a fase terminal em 26 semanas. Os resultados são importantes para estudos comparativos de imunopatologia dentro da mesma e entre variedades de modelos murinos de neurodegeneração crônica na doença prion induzida pelo agente ME7.

Palavras-chave: Neurodegeneração, Suíça albina, Comportamento, Imunopatologia

ABSTRACT

In the present report we described behavioral and neuropathological changes induced by ME7 prion agent inoculated into CA1 of the albino Swiss mice and confirmed previous descriptions in the murine model of prion disease C57Bl6J with two exceptions: 1) septal region present higher level of microglial activation and reactive astrocytosis 2) disease progression (from inoculation to death) is 4 weeks longer and on average, early behavioral changes start correspondently 4 weeks later in albino Swiss mice. Neuronal counts did not reveal any significant changes between the experimental groups. Comparative analysis of activated microglia and perineuronal nets by optical fractionator revealed significant differences between 15 and 18 weeks: the microglial total number increased in this period of time whereas perineuronal nets decreased (t test, two-tailed analysis $p < 0.05$) Cluster and discriminant subsequent analysis applied to behavioral studies revealed that burrowing activity distinguished the occurrence of two subgroups with differential sensitivity to the ME7 agent: one group (40% of the subjects) where the disease progression is faster and the terminal stage is reached in 22 weeks and another one (60%) with slower progression and terminal stage at 26 weeks post-inoculation. The results are important for comparative studies of the immunoneuropathology of chronic neurodegenerative disorders in general and for prion disease itself.

Keywords: murine prion disease, sickness behavior, Immunoneuropathology, albino Swiss mice, C57Bl6J

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Precedimentos Experimentais e número de Animais
- Quadro 2 Animais e Áreas de Interesse Investigadas
- Quadro 3 - Passos da reação de imunohistoquímica para Neu-N.....
- Quadro 4- Passos da reação de imunohistoquímica para Astrócitos.....
- Quadro 5 - Passos da reação de histoquímica para Microglia ativada.....
- Quadro 6 - Passos da reação de histoquímica para detecção da Rede Perineuronal.....
- Quadro 7 Passos da reação de imunohistoquímica para PrP^{SC}
- Quadro 8- Passos da coloração de Nissl.....
- Quadro 9 Início das alterações comportamentais e neuropatológicas nos murinos de doença prion das variedades C57BL/6j e Albina suíça.....

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sumaria as semelhanças e contrastes entre a doença de Alzheimer e a doença prion no que concerne ao quadro neuropatológico justificando a utilização da doença prion como modelo para estudos de neurodegeneração crônica.....32
- Figura 2 - Princípio do fracionador óptico aplicado ao hipocampo e giro denteado.....43
- Figura 3 - À esquerda fotomicrografia do sítio de injeção em CA3 (asterístico) indicando o feixe de fibras musgosas (seta) originário do transporte retrógrado da ADB de baixo peso molecular. A direita em maior detalhe as células granulares e as camadas do giro denteado. À direita ampliação para visualização de detalhes de parte da região ilustrada no baixo aumento à esquerda. Mol, molecular; Gr, granular; Pol, polimórfica.....72
- Figura 4 - Sítio de injeção no GD, mostrando a marcação por ADB na camada granular. A seta aponta para fibras musgosas marcadas por transporte anterógrado a caminho de CA3, a cabeça de seta aponta para corpo celular de célula granular. Escala 200 μ m.....73
- Figura 5 - Fotomicrografias em baixo aumento de secções horizontais do cérebro de fêmea adulta do camundongo suíço albino ilustrando os sítios de injeção nos córtices entorrinal lateral (a esquerda) e medial (a direita). Como esperado detectou-se focos de marcação em C1, CA3 e no subiculum assim como nos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado. MEA – Área entorrinal medial; LEA – Área entorrinal lateral; PP – Via perfurante; Escala:250 μ m.....74
- Figura 6 - Fotomicrografias em baixo (A, C), médio (B, D) e grande aumento (E) de secções horizontais do cérebro do camundongo albino ilustrando as camadas (coloração de Nissl) e as fibras marcadas pelo transporte de dextrana biotinilada a partir do córtex entorrinal. As regiões dentro do quadrado branco (A, C) são ampliadas em B e D para ilustrar as terminações nos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado. Em E, fotomicrografia em alto ganho de um fragmento de axônio isolado ilustrando botões de passagem (seta) e botão terminal (cabeça de seta) MEA – Área entorrinal medial; LEA – Área entorrinal lateral; PP – Via perfurante; IMOL – terço interno da camada molecular; MMOL – terço médio da camada molecular; OMOL – terço externo da camada molecular; GR – camada granular; PO – camada polimórfica. Escala: 250 μ m.....75
- Figura 7 - Fotomicrografias dos sítios das projeções de CA1 duas semanas após injeção iontoforética de dextrana biotinilada em fêmea adulta do camundongo albino Suíço. São ilustrados os focos de marcação anterógrada encontrados no Septum, no Córtex Entorrinal e no

Subiculum. A seta na figura em grande aumento ilustra projeção axonal em direção à camada oriens. Escalas: maior aumento 25µm; menor aumento 250µm

- Figura 8 - Fotomicrografia de secção submetida à imunomarcção seletiva para proteína nuclear NeuN em fatia do giro denteado e parte do hipocampo dorsal (CA3 e CA2) de fêmea adulta do camundongo da variedade suíça albina. Or, oriens; Pir, piramidal; Rad, radiatum; Lac Mol, lacunosum molecular; Mol, molecular; Gr, granular; Po, camada polimórfica.....76
- Figura 9 - Fotomicrografias em baixo (A), médio (B) e grande aumento (C) para ilustrar a arquitetura do hipocampo e do giro denteado, a extensão e os tipos de redes perineuronais respectivamente em secção do cérebro de um animal sadio. Notar a clara distinção entre os campos hipocámpais CA1, CA2 e CA3 (A), a extensão da rede envolvendo o soma (seta preta) e ramos dendríticos (seta branca) de neurônios hipocámpais (B) e a distinção entre os tipos I e II de redes perineuronais (C) a partir da histoquímica para a Wisteria floribunda biotinilada.....77
- Figura 10 - Fotomicrografias de secções reagidas por histoquímica para lecitina Lycopersicum esculentum biotinilada, contrainformadas pelo Nissl para detecção de microglias ativadas nas camadas polimórfica do giro denteado, radiatum de CA3 e septum medial para ilustrar o estado de ativação na 15ª (linha superior) e 18ª (linha inferior) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar a maior ativação no septum e na camada polimórfica do giro denteado em comparação a CA3.....79
- Figura 11 - Fotomicrografias de secções reagidas por imunohistoquímica para proteína ácida fibrilar, contrainformadas pelo Nissl, para detecção de astrócitos reativos nas camadas polimórfica do giro denteado, radiatum de CA3 e septum medial para ilustrar o número de astrócitos reativos 15 (linha superior) e 18 (linha inferior) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar a maior imunomarcção no septum e na camada polimórfica do giro denteado em comparação a CA3.....80

- Figura 12 - Fotomicrografias em baixo aumento de secções provenientes de animais controle (NBH), e infectados com o agente ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação do homogenado cerebral. Notar a redução da atividade histoquímica da matriz extracelular à *Wisteria floribunda* em CA1 (coluna à esquerda), CA3 (coluna central) e septum (coluna à direita) nos animais infectados pelo agente ME7, 15 (linha central) e 18 (linha inferior) semanas após a inoculação em comparação a reatividade da matriz da secção proveniente do animal inoculado com homogenado cerebral não infectado (NBH) (linha superior). NBH – homogenado cerebral normal; S.P.I – semanas pós-inoculação.....81
- Figura 13 - Fotomicrografias das fibras musgosas de animal infectado pelo agente ME7(ME7-18 SPI) e de animal do grupo controle (NBH). As setas em ambas as figuras destacam trecho de uma fibra marcada para ilustrar botões tumefeitos e marcação irregular do axônio no animal doente e marcação homogênea com contornos bem definidos das fibras e dos botões no animal controle.
- Figura 14 . Fotomicrografias da região CA1 de secções do hipocampo de um animal ME7 sacrificado 18 semanas após a inoculação. A esquerda imunomarcagem para a proteína PrP^{Sc}, com inativação parcial da proteína PrP^C por tripsina e a direita imunomarcagem para Neu-N ilustrando vacúolos no parênquima do hipocampo ventral. (*) indicam placa amilóide à esquerda e vacúolo à direita Escalas: baixo aumento 250 µm; grande aumento 25 µm.
- Figura 15 Taxas de ativação microglial calculada pelo índice de contraste entre as estimativas do número total de microglias 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar que a maior taxa de ativação ocorre no septum e a menor em CA1. Diferenças estatísticas significantes foram definidas para valores de $p < 0.05$.
- Figura 16 Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de microglias ativadas (à esquerda) na região septal dos animais inoculados com o agente ME7, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação ao animal inoculado com homogenado cerebral normal (NBH). Não se detectou a presença de microglias ativadas nos animais controles (NBH).
- Figura 17 Representação gráfica da curva de regressão linear para estimativas quantitativas envolvendo microglias ativadas e redes perineuronais na região septal medial e lateral de animais infectados pelo agente ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação.

- Figura 18 Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de microglias ativadas (à esquerda) em CA1 dos animais inoculados com o agente ME7, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação ao animal inoculado com homogenado cerebral normal (NBH). Não se detectou a presença de microglias ativadas nos animais controles (NBH)
- Figura 19 Diferença entre as médias estimadas para os astrócitos da região septal medial dos grupos NBH(1), G2 (2) e G3 (3). Notar que com a progressão da doença a diferença entre o número estimado de astrócitos dos animais infectados e do controle cresce
- Figura 20 Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de astrócitos reativos (à esquerda) na região septal dos animais inoculados com o agente ME7 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação aos animais inoculados com homogenado cerebral normal (NBH)
- Figura 21 Representação gráfica da curva de regressão linear simples aplicada às estimativas numéricas obtidas pelo fracionador óptico a partir de secções dos animais controle (NBH) e infectados, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1
- Figura 22 Representação gráfica das estimativas do número médio de astrócitos, microglias e redes perineuronais na região septal medial e lateral dos animais controle (NBH) e ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação dos homogenados cerebrais normal e infectado.
- Figura 23 Representação gráfica do número estimado de astrócitos e microglias para a camada polimórfica do giro denteado para os animais controle (NBH) e infectados (ME7), 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação. (*) indica diferença estatística significativa (ANOVA, um critério, $p < 0.025$, para astrócitos ou teste bi-caudal $p < 0.05$, para microglias)
- Figura 24 Representação gráfica do contraste entre as médias das estimativas do número de astrócitos e microglias 15 e 18 semanas após inoculação do agente ME7 na camada polimórfica e na região septal em fêmeas adultas do camundongo Suíço albino.
- Figura 25 Representação gráfica da taxa de ativação astrogliar relativa na região septal e polimórfica utilizando o calculo do contraste entre as estimativas do número total de astrócitos obtidos para os grupos NBH e ME7 (G2 e G3).
- Figura 26 Ensaio comportamentais comparados para os testes: ponte de bastões, (acima), campo aberto (meio) remoção de ração (abaixo), À esquerda o desempenho dos camundongos Suíços albinos e à direita o da variedade C57BL/6j, medidos em tempo (s), número de quadrados atravessados e gramas de ração.....97

Figura 27 Representação gráfica demonstrando a existência de formação de grupos distintos. O grupo ME7-P mostrou-se mais sensível em relação ao grupo controle e ME7-T ($p < 0.05$) com quadro clínico precoce (13^a e a 14^a semanas). O grupo ME7-T mostrou-se mais resistente em relação ao grupo ME7 -P ($p < 0.05$) com quadro clínico tardio (21^a e a 22^a semanas).....

Figura 28 Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferencial não homogênea. Fonte: (Gardella et al., 2003)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Parâmetros Experimentais e Número de Microglias Ativadas contadas (ΣQ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15^a (G2) ou na 18^a (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾
- Tabela 2 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE)
- Tabela 3 - Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Microglia Ativada (ΣQ) na camada polimórfica do giro denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7⁽¹⁾
- Tabela 4 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE)
- Tabela 5 - Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Microglia Ativada (ΣQ) em CA1 de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7⁽¹⁾
- Tabela 6 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) em CA1 de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço com Coeficiente de Erro (CE) para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE)
- Tabela 7 - Parâmetros Experimentais e Número de Redes Perineuronais contadas (ΣQ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15^a (G2) e na 18^a (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7 e respectivos controles (NBH)⁽¹⁾
- Tabela 8 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Redes Perineuronais (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2)

e na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 e respectivos controles (NBH)⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE)

- Tabela 9 - Parâmetros Experimentais e Número de Astrócitos Reativos contados ($\sum Q^-$) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15^a (G2) ou na 18^a (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾
- Tabela 10 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Astrócitos Reativos (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).
- Tabela 11 - Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Astrócitos Reativos ($\sum Q^-$) na Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) Semanas após a Inoculação do agente ME7⁽¹⁾
- Tabela 12 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Astrócitos Reativos (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).
- Tabela 13 - Parâmetros Experimentais e Número de Neurônios Contados ($\sum Q^-$) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15^a (G2) ou na 18^a (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾
- Tabela 14 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).
- Tabela 15 - Parâmetros experimentais e total de neurônios ($\sum Q^-$), para a Camada Granular do Giro Denteado de fêmeas adultas do camundongo albino Suíço do grupo controle (NBH) e do grupo sacrificado 18 semanas após a inoculação do agente ME7 (G3)⁽¹⁾
- Tabela 16 - Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Granular do Giro

	Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾ . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE)
Tabela 17	Parâmetros Experimentais e Total de Neurônios Contados (ΣQ), para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 Semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾
Tabela 18	Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾ . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).
Tabela 19	Parâmetros Experimentais e Total de Neurônios Contados (ΣQ), para a Camada Molecular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 Semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾
Tabela 20	Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Molecular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾ . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).
Tabela 21	Números Estimados para as Camadas Granular, Polimórfica, Molecular e total do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais NBH e ME7, 18 Semanas após as Inoculações
Tabela 22	Sumário dos achados encontrados em diferentes janelas temporais para as duas variedades estudadas

1 INTRODUÇÃO

Segundo as projeções estatísticas da Organização Mundial da Saúde, entre 1950 e 2025, a população de idosos no Brasil crescerá 16 vezes contra 5 vezes da população total, o que nos colocará em termos absolutos como a sexta população de idosos do mundo (Garrido e Menezes, 2002).

Para o planejador de políticas públicas esse aumento na expectativa de vida arrasta consigo impacto econômico sobre as contas públicas que pode ser prontamente medido pelo fato amplamente reconhecido de que os maiores gastos com saúde se dão no último ano de vida em decorrência do acréscimo correspondente das necessidades de cuidados de enfermagem domiciliar, que exigem cerca de quatro vezes mais recursos (Wick G, 2000).

Além disso essa expansão da vida trouxe consigo o aumento da prevalência de uma série de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, com a doença de Alzheimer (DA) assumindo a primeira posição em importância. De fato em 1996, já se detectara que a maior percentagem de óbito por quantidade de internações registradas pelo SUS, deveu-se a doença de Alzheimer (6,6%) e desde então esse número só tem aumentado, o que demonstra o elevado custo que essa patologia representa para a sociedade. Esses e outros achados confirmam que o idoso, em relação às outras faixas etárias, consome muito mais do nosso Sistema de Saúde e que este maior custo não reverte em seu benefício.

Assim, é útil e importante investigar as bases biológicas das doenças crônicas neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, sendo as despesas decorrentes de projetos dessa natureza de interesse público e essenciais para gerar evidências

que permitam ao formulador de políticas de saúde tomar decisões acertadas (Kalaria, Maestre *et al.*, 2008).

Este trabalho que pretende implantar como modelo para estudos de neurodegeneração crônica no camundongo adulto da variedade Suíça Albina a doença prion induzida pelo agente ME7, é parte de um esforço maior desenvolvido pelo Laboratório de Neurodegeneração e Infecção da UFPA em associação com o Grupo de Estudos em Inflamação da Universidade de Southampton, e o Dep de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas, buscando compreender os mecanismos neuropatológicos associados ao comportamento doentio ao longo do processo de interação entre neurodegeneração crônica e infecção. O objetivo final é capacitar pessoal em neurodegeneração crônica e infecção de modo a podermos enfrentar os desafios impostos pelo deslocamento demográfico em curso.

1.1 EXPANSÃO DA POPULAÇÃO IDOSA NO BRASIL E NO MUNDO E O CUSTO SOCIAL DO ENVELHECIMENTO

Estudos prospectivos feitos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que em 2020, o mundo contará com mais de 400 milhões de idosos. Realmente 20% da população do mundo industrializado já está acima de sessenta anos de idade e a proporção daqueles acima de 85 anos está crescendo seis vezes mais rápido do que a população como um todo. Desse contingente cerca de 50% torna-se demente como uma consequência de processos neurodegenerativos. Dentre todos os países são os do terceiro mundo que em números absolutos detem hoje a maioria das pessoas com sessenta anos ou mais e daqui a menos de 30 anos em função da rápida substituição das grandes populações idosas dos países europeus pelas de “países jovens” oito

deles conterão as populações mais velhas (Kalaria, Maestre *et al.*, 2008; Prince, Acosta *et al.*, 2008).

No Brasil em particular, neste final de século, assistimos a um deslocamento demográfico da população onde a faixa etária de 60 anos ou mais é a que mais cresce em termos proporcionais. Esse crescimento e deslocamento demográfico da população brasileira na faixa etária de mais de 60 anos tem sido motivo de grande interesse por parte dos estudiosos da terceira idade em vários países do mundo. As projeções estatísticas demonstram que a proporção de idosos no país que estava em 7,3% em 1991 (11 milhões) passará para cerca de 15% em 2025, que é a atual proporção de idosos da maioria dos países europeus, que tiveram sua transição mais lenta e que ainda não conseguiram equacioná-la (Garrido e Menezes, 2002).

Na população idosa, as doenças crônicas neurodegenerativas são um sério e complexo problema, de alta importância epidemiológica, a ser resolvido. As duas patologias mais diagnosticadas são o Mal de Parkinson e o de Alzheimer, com esta última em maior prevalência (Qiu, De Ronchi *et al.*, 2007). Os registros do SUS revelam que em 1996, 450.000 a 600.000 casos de demência foram diagnosticados e motivaram internações em nosso país. Considerando que a doença de Alzheimer representa em torno de 50% desses casos e que a sobrevida média de seus portadores seria de 15 anos após o início da mesma, teríamos cerca de 15.000 a 20.000 casos de morte por Alzheimer por ano. As instituições públicas parecem atentas para o fato e iniciaram alterações de infra-estrutura adaptadas ao idoso assim como deram partida ao treinamento maciço de profissionais da área da saúde para permitir cuidado especializado aos mais de 32 milhões de idosos esperados em 2020 (ver o documento “Programa de Saúde do Idoso” em www.saude.gov.br)

Diante desses números é relevante que se compreenda melhor o impacto das doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento assim como os fatores de risco que podem acelerar os seus cursos temporais, para que desenvolvamos capacidade instalada para enfrentar os desafios impostos pela maior expectativa de vida alcançada neste século. É esperado que os estudos dedicados a investigar as interações entre as doenças crônicas neurodegenerativas e os fatores de risco relacionados, gerem informações fundamentais para orientar políticas públicas baseadas em evidências.

No que concerne a neurodegeneração crônica associada à doença de Alzheimer, é relevante desenvolver modelos experimentais que simulem o quadro neuropatológico e comportamental para identificar as áreas e as células do sistema nervoso central alteradas pela doença em suas fases iniciais, de modo a investigar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes e fatores de risco relacionados, sendo esse o principal objetivo do presente trabalho.

No sentido de orientar a escolha de um modelo experimental um conjunto de observações em humanos consolidou a idéia de que mudanças patológicas no córtex entorrinal (CE) e no hipocampo contribuem decisivamente para o declínio cognitivo e perda de memória em várias doenças neurais, incluindo as doenças crônicas neurodegenerativas associadas ao envelhecimento como a doença de Alzheimer.

Dos vários modelos implantados para estudos de neurodegeneração crônica, tem ficado claro que a neuropatogênese das doenças prion parece incluir a maioria dos eventos identificados na doença de Alzheimer, embora não todos, incluindo os alvos celulares, as áreas cerebrais afetadas e as alterações comportamentais (Eikelenboom, Bate *et al.*, 2002; Kovacs e Budka, 2008).

Diante dessa coincidência de alvos neuroanatômicos e alterações neuropatológicas e comportamentais é útil rever a organização funcional da formação hipocampal normal e alterada pela neurodegeneração crônica de modo a poder investigá-la em detalhes no modelo experimental utilizado no presente trabalho.

1.2 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL EM CÉREBROS NORMAIS.

O termo formação hipocampal é usado para designar uma grande região do lobo temporal de mamíferos que inclui o hipocampo propriamente dito, o giro denteado, o subiculum e o córtex entorrinal (Squire et al., 2004). O termo hipocampo corresponde à região que contém a banda fina de células piramidais que Lorente de Nó (1934) dividiu em quatro regiões menores que constituem o *Cornu Ammonis*: CA1, CA2, CA3 e CA4 (Rosene and van Hoesen, 1987). O hipocampo (CA1 a CA4) é uma região do arquicórtex que é também subdividida em região superior e inferior (Brown and Zador, 1990) ou região septal (dorsal) e região temporal (ventral) (Blackstad, 1956; van Groen et al., 2003). CA1, CA2 e CA3 formam o hipocampo propriamente dito, mas como CA2 é pequeno e indistinto em algumas espécies ele é freqüentemente incluído em CA1 nas análises.

Mais recentemente os limites arquitetônicos de CA2 foram demarcados com maior precisão através da utilização da histoquímica para revelação de terminais de açúcares (glicosaminoglicanos) presentes nas redes perineuronais da matriz extracelular e facilitando sua análise individual. A distribuição desses açúcares distingue CA2 de CA1 e CA3 em função da maior concentração daqueles na matriz extracelular de CA2. Para reconhecer sua distribuição na matriz utiliza-se a lectina *Wisteria floribunda* conjugada com biotina ou com fluoresceína que reage com

glicosaminoglicanos ligados aos proteoglicanos da matriz de forma seletiva indicando os locais de sua ocorrência (Bruckner et al., 2003b). A área entre o GD e o *stratum pyramidale* de CA3 é chamada de Polimórfica ou região hilar ou simplesmente hilus (Brown and Zador, 1990).

O hipocampo apresenta fundamentalmente três camadas, a camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*) e camada molecular (*stratum radiatum e stratum lacunosum-moleculare*). O GD consiste em camada polimórfica (*hilus*), camada granular (*stratum granulosum*) e a camada molecular (*stratum moleculare*) que é continua com o hipocampo (Brown and Zador, 1990). Os principais neurônios do hipocampo são os neurônios piramidais de CA1, CA2 e CA3 e as células granulares do GD. As conexões sinápticas no hipocampo são geralmente axodendríticas e axosomáticas e os principais neurotransmissores são, GABA, norepinefrina e acetilcolina (Brown and Zador, 1990).

O hipocampo é considerado por alguns como uma das mais complexas áreas de associação multimodal (Swanson, 1983), parcialmente porque este recebe e integra informação de todas as modalidades sensoriais. O hipocampo compreende assim várias áreas com propriedades diferentes que ainda não estão bem estabelecidas (Eichenbaum, 2006; Kesner et al., 2004; Rolls and Kesner, 2006; Squire et al., 2004) mas é a presença do giro denteado que distingue a formação hipocampal dos mamíferos da de outras classes que embora possuam a formação hipocampal, não contam com o trabalho do giro denteado de amplificar a capacidade computacional dos sinais provenientes do córtex entorrinal a caminho das células piramidais de CA3 (van Groen et al., 2002).

As células em CA3 recebem sobre seus dendritos apicais projeções diretas da camada II do córtex entorrinal através da via perfurante que em seu caminho

emitem colaterais axonais que fazem sinapse com as células granulares do giro denteado cujos axônios constituem as fibras musgosas. Estas últimas se projetam, exclusivamente, para CA3 conectando-se às células piramidais em região próxima ao soma, replicando e intensificando o sinal que receberam através da via perfurante.

As aferências mais densas do hipocampo provêm do córtex entorrinal e a propagação da informação entorrinal aferente no interior do hipocampo se dá através de uma seqüência de sinapses excitatórias que de uma forma simplificada é referida como um circuito trisináptico. A primeira sinapse desse circuito se dá na camada molecular, entre as fibras do córtex entorrinal, que constituem a via perfurante, e as células granulares do giro denteado. A segunda ocorre nos *strata lucidum* e *radiatum* entre os axônios das células granulares do giro denteado (fibras musgosas) e os neurônios piramidais de CA3, de onde partem os axônios (colaterais de Schaffer) para formar a terceira sinapse com as células piramidais de CA1. Nesse sentido, as operações funcionais intrínsecas que ocorrem tanto no giro denteado quanto no córtex entorrinal tem um papel importante no processamento subsequente da informação e consolidação da memória (Turner et al., 1998).

Somam-se as projeções do córtex entorrinal para o hipocampo as projeções septo-hipocampais que parecem estar envolvidas com o comportamento exploratório e a memória operacional espacial. Realmente, há evidências de que lesões produzidas no septum medial prejudicam a organização do comportamento exploratório assim como diminuem a taxa de aprendizado de localização da plataforma escondida no labirinto aquático de Morris (Martin et al., 2007). Durante o envelhecimento essas projeções ao serem danificadas, são fortemente correlacionadas aos déficits de memória de trabalho e.g. (Fischer et al., 1989;

Ingram et al., 1981; Markowska et al., 1995). Além disso a modulação intraseptal de receptores muscarínicos tem contribuição importante sobre a projeção septo-hipocampal colinérgica, alvo principal das alterações neuropatológicas associadas a déficits de desempenho em tarefas hipocampo-dependentes associadas ao envelhecimento (Elvander et al., 2004). Mas é através do giro denteado que o córtex entorrinal exerce sua maior influência no hipocampo.

O que se tem denominado de giro denteado nos mamíferos é uma estrutura trilaminar, com as características do córtex primitivo ou allocórtex composto pelas seguintes camadas: molecular, granular e hilar ou polimórfica. A região mais externa, a camada molecular é relativamente livre de células e contém os dendritos das células granulares, os terminais da via perfurante e as fibras intrínsecas de associação e comissurais das células musgosas (Houser, 2007; Leranth and Hajszan, 2007).

A camada molecular recebe de forma segregada os axônios do córtex entorrinal medial e lateral com o terço médio sendo reservado às projeções do primeiro e o terço externo ao último (Witter and Moser, 2006). A camada de células principais é composta por um aglomerado de células densamente compactadas denominadas de células granulares com corpos celulares com 8 a 12 μm que projetam dendritos que se bifurcam muito próximos ao soma e que ocupam a camada molecular (Amaral et al., 2007).

A terceira camada que corresponde à região hilar, de disposição mais profunda no giro denteado, está subjacente à camada de células granulares, estendendo-se até as proximidades dos dendritos das células piramidais de CA3. Por essa vizinhança com CA3 a camada granular é subdividida em lâminas

designadas supra e infra-piramidais de acordo com sua posição em relação à camada de células piramidais de CA3. No hilo, as células musgosas são os neurônios mais freqüentes, mas mesmo assim são 25 a 30 vezes menos abundantes do que as células granulares (Amaral et al., 2007).

Apesar desse número reduzido as células musgosas da região hilar realizam um papel importante na modulação da eferência do giro denteado. De natureza glutamatérgica as células musgosas correspondem à metade da população neuronal do hilo, enquanto vários grupos de interneurônios inibitórios gabaérgicos constituem a metade restante (Amaral, 1978). As propriedades anatômicas e fisiológicas das células musgosas levaram à hipótese de que elas possuem um papel importante na coordenação das funções hipocampais normais, uma vez que déficits de memória e aprendizado são freqüentemente observadas em animais com danos nos neurônios hílares. As células musgosas estão envolvidas em modular especificamente a atividade da célula granular em sua projeção para CA3 e integram a função hipocampal em áreas anatômicas mais vastas; no entanto, o amplo campo de conectividade da célula musgosa pode predispor-los a morte celular excitotóxica (Magloczky and Freund; 2005; Magloczky and Freund, 1993).

Somam-se a essas ações modulatórias as aferências excitatórias do córtex entorrinal que representam o maior conjunto de aferências extrínsecas para o giro denteado (van Groen et al., 2002; van Groen et al., 2003) e cuja integridade parece essencial para todas as tarefas hipocampo-dependentes tais como consolidação do aprendizado e formação de memória episódica (Eichenbaum et al., 2007; Witter, 2007; Witter and Moser, 2006). Dando suporte a essa premissa há uma série de evidências experimentais implicando os córtices perirrinal, pósrrinal e entorrinal em

processos fisiológicos que estão associados ao reconhecimento da identidade e da localização de objeto.

Essas funções permanecem largamente segregadas nos córtices perirrinal e parahipocampal projetando-se separadamente para os córtices entorrinal medial e lateral respectivamente (Lipton and Eichenbaum, 2008). Dos córtices entorrinais medial e lateral em diante, as vias convergem sobre o hipocampo (CA1, CA2, CA3) e o giro denteado através das vias perfurantes medial e lateral que ao se dirigirem ao giro denteado contatam respectivamente os terços médio e externo da camada molecular ocupados pelos dendritos das células granulares (Amaral et al., 2007; Dolorfo and Amaral, 1998a; van Groen et al., 2002; van Groen et al., 2003). Embora todas essas projeções tenham origem nas camadas II ou III dos córtices entorrinal medial e lateral, há outra projeção menos densa, originada nas camadas V e VI do córtex entorrinal, que ocupa o terço interno da camada molecular do giro denteado (Deller et al., 1996).

Tomados em conjunto, os dados revelam que a célula granular do giro denteado recebe simultaneamente as projeções das vias responsáveis pelas tarefas de reconhecimento, da localização espacial e da forma dos objetos deixando em aberto o significado funcional dessa convergência.

A perda de neurônios hilares relacionadas com a idade é provavelmente resultado de aumento da morte celular decorrente do estresse oxidativo (Kiatipattanasakul et al., 1996) possivelmente devido à deposição beta-amilóide (Tapp et al., 2004), a inflamação subsequente, o dano oxidativo (Head et al., 2002) e o dano no DNA (Anderson et al., 2002).

A inflamação no sistema nervoso central é caracterizada por complexas formas de resposta celular e molecular ao estresse, ao dano por traumatismos ou por infecção, numa tentativa de defender o cérebro contra os danos instalados, removendo debris celulares e neurônios lesados trazendo o ambiente cerebral de volta a homeostase. A inflamação no SNC é disparada pela ativação da microglia, astrócitos e macrófagos periféricos infiltrantes que liberam uma plethora de citocinas anti e pro-inflamatórias, quimiocinas, neurotransmissores e radicais livres que é função da severidade da inflamação (Whitney et al., 2009).

Ratos idosos perdem neurônios hilares, mas esta perda não é aparente até os 22 meses de idade (Azcoitia, Perez-Martin *et al.*, 2005); (Cadacio, Milner *et al.*, 2003); (Shetty e Turner, 1999). Em contrapartida, modelos de envelhecimento em primatas não humanos não encontraram perda equivalente de neurônios com o envelhecimento normal no hipocampo (Keuker, De Biurrun *et al.*, 2004). Da mesma forma que na doença prion, em humanos não há perda de neurônios hipocampais em estágio pré-clínico da DA, porém quando comparamos idosos do grupo controle com idosos com a DA na fase clínica e construímos curvas de regressão ao longo de 22 anos (valor máximo de sobrevivência), uma redução no número total de neurônios de 87% em CA1, 77% no subículo e 63% no hilo respondem por parte importante do declínio cognitivo observado na DA (Bobinski, Wegiel *et al.*, 1997; West, Kawas *et al.*, 2004).

1.3 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL ALTERADA PELA NEURODEGENERAÇÃO CRÔNICA EM MODELO MURINO DE DOENÇA PRION E NA DOENÇA DE ALZHEIMER.

Doenças príon representam um conjunto de doenças naturalmente transmissíveis, fatais, que evoluem com encefalopatia caracterizada por alterações comportamentais e neuropatológicas que afetam predominantemente o sistema límbico. A DA se manifesta por um progressivo declínio cognitivo, apresentando inicialmente, perda de memória que evolui afetando todas as outras faculdades cognitivas com alterações estruturais que podem ser detectadas in vivo, mesmo em suas fases iniciais, com técnicas modernas de neuroimagem (Apostolova and Thompson, 2008). Na DA, há formação de depósitos β amiloides ($A\beta$) e aglomerados neurofibrilares que ocorrem em um modelo espacial e temporal definido em regiões hipocampais e neocorticais específicas sendo a via perfurante o circuito mais vulnerável com respeito a ambos, envelhecimento e DA (Morrison and Hof, 1997). O córtex entorrinal, origem da via perfurante, é considerado a primeira área que mostra alterações neuropatológicas na DA, onde a perda de neurônios é sucedida por progressão rápida da doença (Braak and Braak, 1991). A presença de placas amilóides no parênquima, ativação microglial, astrocitose e perda neuronal em proporções variáveis nas diferentes regiões e espécies até então estudadas torna o quadro neuropatológico da doença príon comparável ao da doença de Alzheimer (Eikelenboom et al., 2002; Zilka et al., 2006).

Três elementos comuns parecem contribuir de forma aditiva para os danos neuropatológicos observados nas doenças prion e na doença de Alzheimer: a neuroinflamação, o estresse oxidativo e o dano vascular. Doenças prion são caracterizadas por depósito extracelular de fibrilas amilóides protease-resistentes denominadas PrP^{SC} que constituem isoformas da proteína PrP^C largamente distribuída no SNC (Oesch et al., 1985; Prusiner, 1991). A proteína PrP^C parece ser

essencial a uma variedade de funções e sua alteração durante a progressão da doença concorre para uma série das alterações observadas.

A resposta microglial intensa medida através de imunomarcação específica nas regiões afetadas do SNC, de pacientes com Alzheimer, com a doença prion humana de Creutzfeldt-Jacob e em modelos murinos de doença prion caracterizam a presença de resposta inflamatória local que se agrava e se mantém ao longo da doença (Eikelenboom et al., 2002; Lucassen et al., 1995; Sasaki et al., 1993; Williams et al., 1994a; Williams et al., 1994b). Assim o aparecimento dos depósitos amilóides parece estar associado à resposta inflamatória crônica, atípica, que parece constituir denominador comum dos processos patogênicos encontrados na doença prion e na doença de Alzheimer. O melhor argumento para essa descrição decorre das observações histopatológicas e imunohistoquímicas de recrutamento e acumulação local de microglia (fagócitos residentes no SNC) preenchendo o critério clássico proposto por Metchnikoff em 1892 para caracterizar a presença de um processo inflamatório.

A atipia na doença prion é confirmada pela presença de apenas dois dos principais mediadores inflamatórios elevados, a prostaglandina E₂ e o fator de crescimento β 1 (transforming growth factor- β 1), mas com 3 das citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 β , interleucina-6 e fator- α de necrose tumoral (TNF- α), sem mudança significativa (Perry et al., 2002). Além disso a ativação microglial característica da resposta inflamatória ocorre em regiões de perda sináptica ao invés de nas áreas de depósito de PrP^{Sc} (Cunningham et al., 2003). Assim, a expressão atípica é reservada para o fato de que não preenche todos os critérios exigidos para caracterizar uma resposta inflamatória completa enquanto que a expressão crônica é

reservada para explicitar o fato de que ela não se resolve ao longo do tempo tornando-se crônica (Eikelenboom et al., 2002).

Em modelos murinos de doença príon as mudanças patológicas iniciais parecem ocorrer após deposição ou acumulação de proteína prion alterada (PrP^{Sc}), em uma região particular do cérebro (Betmouni et al., 1999; Giese et al., 1995; Williams et al., 1997). Da mesma forma em humanos com doença de Alzheimer, dados recentes baseados em tomografia por emissão de pósitrons (PET), com marcador específico para microglia ativada, revelaram que a ativação microglial é um evento precoce na patogênese da doença (Cagnin et al., 2001). Sucedendo a ativação microglial estabelece-se o processo de destruição da neurópila com alterações sinápticas e dendríticas que se estabelecem antes dos processos apoptóticos associados à morte neuronal tanto em pacientes com a doença de Alzheimer quanto em modelos murinos de doença prion (Jeffrey M et al., 2000; Williams et al., 1994a; Williams et al., 1997)

Semelhantemente, estudos topográficos empregando microressonância magnética (muMRI) em modelo murino de doença prion com campo magnético de alta resolução (9.4 Tesla), revelaram as primeiras mudanças de sinal ponderado em T2 no septum e no hipocampo 12 semanas após a inoculação, e alterações intensas associadas a graves déficits neurológicos 24 semanas depois (Sadowski et al., 2003). Estudos complementares quantificando as mudanças observadas nas imagens de ressonância magnética e espectroscopia por ressonância magnética revelaram alterações detalhadas da fase pré-clínica coincidentes com a ativação microglial, a hiperatividade no campo aberto e a presença de perfis alterados de metabólitos revelados pela espectroscopia e.g. (N-acetil aspartato/colina e N-acetil aspartato/creatina) no tálamo e hipocampo (Broom et al., 2007). Resultados de

espectroscopia semelhantes foram obtidos nas fases iniciais da doença em modelo murino, utilizando homogenado cerebral derivado de encefalopatia espongiiforme bovina (Vidal et al., 2006).

Outro achado celular tão relevante quanto a alteração microglial é a astrocitose hipertrófica, com regulação para cima da proteína fibrilar ácida (GFAP) e das enzimas astrocíticas coincidentes com a elevação de PrP antes do aparecimento das lesões neuropatológicas (Kovacs and Budka, 2008). Na verdade astrócitos e neurônios parecem ser os maiores sítios de replicação do agente infectante da doença prion induzindo sinalização precoce através de quimiocinas que conduzem ao recrutamento microglial subsequente (Mathieu and Chabry, 2004). As ações dos astrócitos diante de um processo indutor de lesão crônica tal como na doença prion e na doença de Alzheimer que arrastam consigo ativação astrocitária igualmente crônica, parecem ir além das ações benéficas identificadas nas lesões agudas, contribuindo para aumentar o dano tecidual fazendo a doença progredir (Mraka and Griffin, 2001).

Essas ações parecem estar associadas a superexpressão da proteína S100B, um mensageiro químico intercelular em astrocitos ativados (Sheng JG et al., 1994). Dezenove proteínas da família S100 foram descritas expressando-se em vários tecidos envolvidas com a regulação intracelular de cálcio associado à múltiplas funções cálcio dependentes tais como fosforilação de proteínas, atividades enzimáticas, proliferação e diferenciação celular, construção e reparo do citoesqueleto assim como homeostase do cálcio propriamente (Donato, 1999).

Dentre essas, a S100B é a mais abundante nas células da glia do sistema nervoso central onde parece contribuir para o crescimento de neuritos e a sobrevivência de subpopulações neuronais pós-lesão e durante o desenvolvimento,

assim como estimula a proliferação e hipertrofia de astrócitos (Griffin et al., 1995; Shashoua et al., 1984). Astrócitos ativados são componentes indissociáveis das placas amilóides na doença de Alzheimer onde são encontrados na periferia daquelas envolvendo os depósitos amilóides com processos espessos que envelopam a placa e finos que se expandem para o centro dela (Mandybur and Chuirazzi, 1990). É possível entretanto encontrar astrócitos ativados nos estágios iniciais da doença antes da formação de placas propriamente, quando o depósito amiloide ainda é difuso (Mrak et al., 1996).

Pacientes com distúrbio cognitivo leve, nas fases iniciais da doença, mostram um aumento expressivo do número de astrócitos associados a um reduzido número de placas enquanto que em pacientes nos estágios finais, o número de astrócitos associados à placas está diminuído, sugerindo que a astrocitose reativa parece contribuir principalmente para a patologia dos estágios iniciais (Pike et al., 1995).

A análise ultraestrutural aplicada a doença prion em modelo murino induzida pelo agente ME7, revelou a presença de vacúolos em astrócitos, oligodendrócitos, mielina, em dendritos, no soma neuronal e em menor frequência em terminais axonais, (Jeffrey et al., 1995). Além disso esses estudos identificaram perda sináptica no hipocampo decorridos 40% da extensão temporal da doença coincidindo com o aparecimento das placas amilóides (Jeffrey M et al., 2000). Varicosidades, aparecimento de esferóides e decréscimo das espinhas dendríticas apareceram de forma mais freqüentes nos estágios terminais, mas já podem ser detectados tão cedo quanto decorridos 50% do curso temporal (Jeffrey et al., 2001).

Em estudo mais recente no camundongo C57Bl6J, onde a doença cursa até sua fase terminal em 175 dias após a injeção intrahipocampal do agente ME7, foi

demonstrado o aparecimento de alterações neuropatológicas mais precoces no hipocampo ventral do que as descritas para o hipocampo dorsal (Franklin et al., 2008). Nesse trabalho os autores demonstram que oito semanas após a injeção intrahipocampal já se encontra ativação da microglia, presença de astrócitos reativos, placas amilóides ocasionais, além de 10% de perda de redes perineuronais de CA1 marcadas pela histoquímica com Wisteria floribunda.

Embora as doenças prion apresentem similaridade morfológica e patofisiológica com outras encefalopatias progressivas crônicas como a DA, elas são únicas por serem transmitidas por inoculação ou ingestão de material contaminado por prion (Glatzel et al., 2008). O marco neuropatológico que as distingue de outros processos neurodegenerativos é revelado pela expressão “espongiforme” que é consequência da formação de vacúolos ovóides individuais ou confluentes de cerca de 10-50µm de diâmetro que se distinguem das fendas vacuolares encontradas na camada II (“spongy degeneration of the second cortical layer”) em fases avançadas de outras doenças neurodegenerativas crônicas e de outros vacúolos irregulares causados por rarefação tecidual ou edema (Kovacs and Budka, 2008).

A Figura 1 modificada de (Eikelenboom et al., 2002) sumaria as semelhanças e contrastes entre a doença de Alzheimer e a doença prion no que concerne ao quadro neuropatológico justificando a utilização da doença prion como modelo para estudos de neurodegeneração crônica.

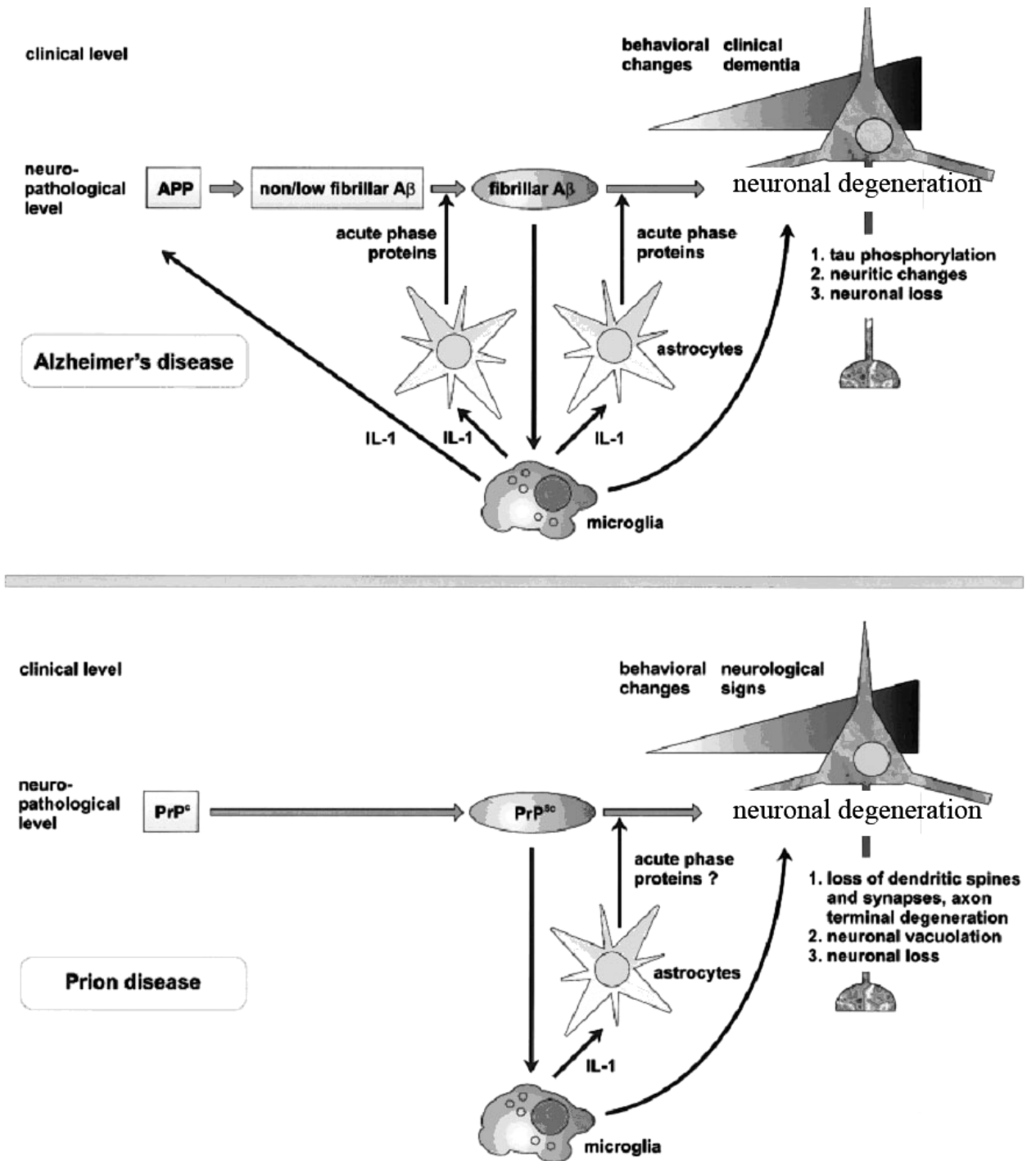


Figura 1. Tanto a Doença de Alzheimer quanto as doenças prion são caracterizadas por sequência de eventos que tem em comum a deposição extracelular de placas amiloides no parênquima. Nos dois casos as placas geram alteração dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e ativação microglial formando agrupamentos no parênquima. A resposta inflamatória crônica antecede a destruição da neurópila em ambos os casos. Na doença de Alzheimer há forte correlação entre o aumento dos níveis séricos de interleucina 1 β e o aumento da síntese da proteína precursora β -amiloide (APP) que por sua vez está associada ao aumento da formação de placas gerando ciclo de retroalimentação positiva que faz a doença progredir. Na figura enfatiza-se a ausência de evidências para esse ciclo de retroalimentação na doença prion (Eikelenboom et al., 2002).

Além da neuroinflamação, também contribui para as alterações neuropatológicas da doença prion o estresse oxidativo. A forte ligação entre estresse oxidativo e doença prion é revelada por duas categorias de eventos patofisiológicos que ocorrem durante a progressão da doença: (1) aumento de produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e espécies de nitrogênio reativo (RNS), seguida por danos celulares oxidativos diretos e (2) interrupção da defesa contra o estresse oxidativo celular (Unterberger et al., 2005). Outras evidências obtidas a partir de imunohistoquímica para marcadores de estresse oxidativo tais como nitrotirosina, um indicador de geração de peroxinitrito (Smith et al., 1997), heme oxigenase-1 (HO-1) enzima responsável pela formação de moléculas antioxidantes (Smith et al., 1994), assim como marcadores de oxidação lipídica (Wong et al., 2001), revelaram aumento importante da quantidade de imunomarcção de neurônios na fase terminal da doença sugerindo fortemente que o estresse oxidativo contribui para o dano neuronal nas encefalopatias espongiformes (Brown, 2005).

De fato há um conjunto de evidências da presença de estresse oxidativo tardio na doença prion por detecção de danos oxidativos em proteínas (Kim et al., 1999), lipídios (Kim et al., 2000; Minghetti et al., 2000), DNA (Guentchev et al., 2000) e por alterações da atividade de enzimas anti-oxidantes (Choi et al., 2000; Thackray et al., 2002). Igualmente tem sido sugerido que a proteína prion (PrP^C) tem papel crucial na resistência ao estresse oxidativo associado a ativação microglial nas encefalopatias espongiformes e.g. (Brown and Kretzschmar, 1997). Nesse sentido tem sido utilizado estratégia indireta para elucidação da patogênese da doença prion tentando explorar o papel fisiológico da PrP^C. Nesses trabalhos as atenções se voltaram para a região estrutural N-terminal da proteína PrP^C que contém uma única seqüência octapeptídica repetida (van Rheede et al., 2003). Usando peptídeos

correspondentes para três das octarepetições de PrP em mamíferos, demonstrou-se uma ligação específica e preferencial a íons de cobre divalentes (Hornshaw et al., 1995). A ligação ao cobre influencia as propriedades estruturais e bioquímicas de PrP^C (Qin et al., 2000) preservando o papel importante na defesa celular contra o estresse oxidativo da PrP^C uma vez que o aumento de sua concentração é associada ao aumento da resistência ao dano oxidativo (Brown and Kretzschmar, 1997).

Em concordância com essa idéia, a atividade aumentada de cobre/zinco-superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), enzimas que contribuem para a proteção contra o dano oxidativo, foi encontrada em células neuronais que expressavam níveis altos de PrP^C (Rachidi et al., 2003). Em camundongos no estágio final de scrapie foi demonstrada por imunohistoquímica uma marcação neuronal difusa para nitrotirosina (NT), um marcador de oxidação (nitrosilação) de proteína (Unterberger et al., 2005). Além disso, marcação aumentada de heme oxigenase-1(HO-1) foi igualmente observada por imunohistoquímica (Guentchev et al., 2000).

Finalmente um terceiro componente fisiopatológico das doenças crônicas neurodegenerativas é a insuficiência microcirculatória devido à alterações regionais da estrutura dos capilares durante o envelhecimento, que parece danificar o sistema de liberação do óxido nítrico (ON), um potente neuromediador associado a uma série de funções dentre as quais o controle do fluxo sanguíneo cerebral (de la Torre and Stefano, 2000; Jiang et al., 2002; Lovick et al., 1999; Montecot et al., 1998), potenciação de longo prazo (LTP) e consolidação de processos relacionados a contribuição hipocampal para formação de memória (Bohme et al., 1993; Haley et al., 1992). A vasodilatação mediada por óxido nítrico decorre do relaxamento do músculo liso em resposta ao estímulo mecânico do endotélio ou a estimulação produzida por

acetilcolina, bradicinina ou outro composto (Arnal et al., 1999). Esses estímulos químicos e mecânicos levam ao aumento da concentração de cálcio citosólico e ativação do complexo cálcio-calmodulina e das enzimas de síntese do óxido nítrico nas células endoteliais (Fleming and Busse, 1999) que por sua vez aumenta a produção de ON aumentando a expressão gênica ou a atividade da sintase de ON endotelial, e-NOS (Arnal et al., 1999). Além disso o ON liberado pode se originar de terminais axonais que contribuem para o controle da regulação do relaxamento endotelial (Farkas and Luiten, 2001).

Durante o envelhecimento uma série de alterações afetam a rede capilar encefálica incluindo depósito de colágeno perivascular (fibrose microvascular) e o espessamento da membrana basal do capilar que dobra a espessura da parede em relação ao capilar normal, especialmente no córtex entorrinal e hipocampo (De Jong et al., 1991; Luiten et al., 1994). Esse espessamento parece contribuir para dificultar o transporte de nutrientes e eletrólitos através da membrana capilar induzindo possivelmente os déficits cognitivos do período senescente por diminuição da oferta de nutrientes e perda da homeostase eletrolítica (Farkas and Luiten, 2001).

Tem sido sugerido que na doença de Alzheimer a formação de placas amilóides agravaria o espessamento da membrana basal do capilar além de ativar a reação microglial associada ao dano celular de uma forma geral comprometendo igualmente a atividade nitrérgica endotelial e neuronal, ampliando o déficit no fluxo sanguíneo dependente de óxido nítrico (de la Torre and Stefano, 2000; Farkas and Luiten, 2001; Law et al., 2001). Nas doenças prion também tem sido descrito a presença de dano nitrérgico através da medida das enzimas de síntese do óxido nítrico que parecem estar reduzidas e anormalmente localizadas principalmente nas fases mais avançadas da doença (Ovadia et al., 1996).

No modelo murino C57Bl6J demonstrou-se que parece haver um padrão bifásico de ativação das enzimas nitrérgicas com regulação para cima nas camadas hipocampais, 13 semanas após a indução da doença, quando as primeiras alterações comportamentais se tornam aparentes, seguida de devastadora regulação para baixo nos estágios avançados da doença (Picanco-Diniz et al., 2004). Nesse momento detectam-se redução no consumo de glicose, na remoção e estocagem de comida e aumento da atividade exploratória no campo aberto associadas à mudanças neuropatológicas no sistema límbico (Cunningham et al., 2003). Em torno de duas semanas antes da fase terminal instalam-se alterações da atividade locomotora e da postura que caracterizam a fase clínica da doença e onde se observam as alterações nitrérgicas mais dramáticas (Hunter et al., 1986; Picanco-Diniz et al., 2004).

Em resumo a neurodegeneração crônica observada na doença prion, parece resultante de uma série de ações combinadas que incluem o tripé: inflamação crônica, estresse oxidativo e alterações vasculares o que a aproxima do quadro neuropatológico revelado pela doença de Alzheimer (Cunningham et al., 2005). Enquanto que os modelos animais disponíveis para a doença de Alzheimer não revelam significativa neurodegeneração (Irizarry et al., 1997) e, embora exibam alguma evidência da ocorrência de inflamação, não se caracterizam como resposta à neurodegeneração.

Todas essas transformações neuropatológicas contribuem para gerar alterações comportamentais que podem revelar antecipadamente os circuitos neuroanatômicos que estão sendo comprometidos durante a progressão da doença, não importa a espécie infectada pelo agente prion (Bruce et al., 1991). No caso do modelo murino, de maior interesse para o presente trabalho, uma série de testes

comportamentais antecipam sinais de progressão da doença muito antes do animal entrar na fase clínica, permitindo correlações estreitas com as mudanças neuropatológicas (Cunningham et al., 2003; Deacon et al., 2005). Com acesso livre a observação direta do cérebro doente em diferentes janelas temporais é possível estudar no modelo murino cada mudança comportamental a luz das alterações celulares e moleculares subjacentes. Por exemplo, já está descrito para o modelo C57Bl6J que as alterações comportamentais mais precoces da doença (Betmouni et al., 1999; Deacon et al., 2001a; Guenther et al., 2001) coincidem com alterações sinápticas hipocámpais (Cunningham et al., 2003). Esses animais demonstram declínio progressivo na polidipsia induzida por glicose, diminuição no comportamento de remoção e estocagem de comida (“burrowing”) e redução na construção de ninhos, 12 semanas após a inoculação do homogenado cerebral infectado pelo agente ME7 (Cunningham, 2005).

Dentre todos os testes comportamentais até o presente, a mensuração da remoção e estocagem de comida em modelo murino C57Bl6J parece ser o teste mais sensível na fase inicial da doença (Cunningham, 2005). Esses comportamentos naturais instintivos que são alterados pela doença, fazem parte de um repertório de respostas neurais coletivamente denominadas de comportamento doentio que é induzido pela liberação de citocinas (Konsman et al., 2002). No modelo murino C57B/6J utilizado no presente trabalho para comparação com a variedade Albina Suíça, tem sido demonstrado que o stratum radiatum do hipocampo, o septum medial e lateral e o córtex entorrinal são as primeiras áreas a exibirem ativação microglial após a injeção do agente ME7 e essa ativação coincide com as alterações comportamentais mais precoces, sugerindo possível correlação entre a ativação

microglial nas áreas afetadas e o comportamento alterado (Cunningham, 2005; Cunningham et al., 2003).

Apesar dessa riqueza de elementos gerados acerca da anatomia patológica da doença prion em modelo murino, permanecem por serem respondidas questões essenciais relacionadas as alterações celulares tais como quais neurônios são mais suscetíveis e morrem primeiro? quais mecanismos estão associados à morte dessas células?. Em que proporção as diversas populações celulares são afetadas nas diversas fases da doença antes que o animal evolua para o óbito empregando análise quantitativa sem viés? (Cunningham, 2005).

O presente trabalho se ocupa dessa última questão durante a fase pré-clínica quantificando, através do fracionador óptico, as alterações celulares mais importantes incluindo a microglia ativada, os astrócitos reativos, os neurônios e as redes perineuronais da matriz extracelular, ao mesmo tempo em que estuda as alterações comportamentais implantando a doença prion em outro modelo murino, a variedade Albina Suíça.

A principal motivação para tal é de que embora tenham sido realizados ensaios quantitativos em camundongos da variedade C57B/6J revelando que nas fases iniciais da doença há astrocitose e ativação da microglia sem perda neuronal detectável e que a partir da 19ª semana pós-injeção, há perda aparente de 40% dos neurônios de CA1 (Cunningham et al., 2003) e presença de vacuolização, não há até o presente, esforço sistemático para quantificar os achados neuropatológicos empregando análise estereológica sem viés. Além disso, um único estudo foi dedicado às alterações da matriz extracelular em modelo murino e os métodos

empregados para quantificação não empregaram procedimentos estereológicos (Franklin et al., 2008a)

1.4 ESTIMATIVAS NUMÉRICAS SEM VIÉS: UM CAPÍTULO RECENTE DA NEUROMORFOLOGIA QUANTITATIVA.

Embora haja um conjunto notável de estudos dedicados a revelar aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais associados à formação hipocampal e a região septal do camundongo, tanto em condições normais como em alteradas, não há esforço sistemático para investigar o número de elementos celulares que compõem àquelas regiões empregando estimativas sem viés (Bonthius et al., 2004; Buckmaster et al., 2002; Fabricius et al., 2008; Long et al., 1998a; Long et al., 1998b; Lorenzi and Reeves, 2006; Mouton et al., 2002; Severi et al., 2005; Wirenfeldt et al., 2003). Quando se fala de estimativas sem viés no contexto da contagem de elementos de interesse em uma dada região, estamos nos referindo a um capítulo da estatística espacial denominada estereologia, que permite a realização de análises quantitativas de estruturas tridimensionais, a partir da reconstrução serial de estruturas bidimensionais (Weibel, 1989). Dado que neste trabalho estima-se número de células empregando o fracionador óptico, é interessante rever, ainda que superficialmente, suas bases conceituais.

A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como menores, maiores, mais largas, menos freqüentes, mais freqüentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (Schmitz and Hof, 2005). Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes apresentam resultados controversos que se devem à

suposições prévias acerca do tecido e da geometria das células e de suas distribuições no plano da secção (Geinisman et al., 1995; Mayhew and Gundersen, 1996). Esses estudos quantitativos eventualmente introduzem viéses de amostragem e/ou erros sistemáticos cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (Gardella et al., 2003; Howard and Reed, 2005; Mandarin-de-Lacerda, 2003; Mayhew and Gundersen, 1996), confocal (Kubinova and Janacek, 2001; Peterson, 1999) ou eletrônica (Fiala and Harris, 2001; Nyengaard and Gundersen, 2006).

A análise microscópica em qualquer nível é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto é necessário considerar que se um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original será de fato analisada em detalhe (Howard and Reed, 2005; Schmitz and Hof, 2005). Para contornar tais vieses empregam-se técnicas estereológicas que estimam o número total dos objetos contidos em uma dada região de interesse através de coleta de informação aleatória e sistemática multiplicando-se o número de elementos de interesse registrados pelos valores de probabilidade da amostra e.g. (West, 2002).

O termo sem viés é utilizado para definir sistemas de amostragem que são independentes das propriedades do tecido onde as dimensões da sonda (caixa de contagem) e os parâmetros amostrais a ela associados (número e intervalo entre elas) são definidos *a priori*, desprezando-se a coleta de dados acerca do tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (Glaser and Glaser, 2000). Assim, os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em

valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas, sem conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado e.g. (Glaser and Glaser, 2000; Schmitz and Hof, 2005; West, 2002).

Dentre todos os procedimentos utilizados para estimar o número total de objetos de interesse dentro de uma determinada região ou camada, o fracionador óptico é o que tem sido usado com mais frequência, pois combina as propriedades da sonda tri-dimensional para contagem dos elementos de interesse (o disector óptico) com o sistema de amostragem sistemática e aleatória (o fracionador) removendo vieses amostrais e pressuposições (West et al., 1991). Essa metodologia foi adotada no presente trabalho e sua utilização para fins práticos é descrita a seguir.

1.4.1 O Fracionador Óptico em Ação

O alvo do presente trabalho é estimar o número de células dentro de um volume específico de tecido, o septum, o hipocampo e o giro denteado, usando investigação estereológica sem viés. Em estereologia esse problema é resolvido utilizando caixas de contagem virtuais (sondas estereológicas) aplicadas a uma série ordenada de secções histológicas obtidas das regiões de interesse. É possível seccionar opticamente as secções histológicas usando objetivas de grande abertura numérica para produzir imagens de baixa profundidade de foco. O plano de foco (ou secção óptica) pode ser deslocado através de distancias conhecidas através da espessura da secção produzindo planos de foco contínuos através dos quais a contagem é feita de acordo com as regras de contagem do disector escolhido. Na

prática o que acontece é a inclusão na contagem de objetos novos que entram em foco (ou saem de foco) enquanto descemos ou subimos dentro da caixa de contagem de volume conhecido.

A combinação do disector óptico com o fracionador de amostras conhecida na literatura como fracionador óptico (West et al., 1991), tem numerosas vantagens práticas sendo a principal, o fato de não ser afetado pela retração do tecido e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento. O fracionador óptico envolve a contagem de objetos (neurônios, astrócitos, microglias e redes perineuronais no presente trabalho), utilizando sondas de disectores ópticos, em uma amostra sistemática uniforme que constitui uma fração conhecida do volume da região em análise.

O princípio do fracionador óptico define que se tomamos uma amostra “x” ao acaso que representa uma fração “f” conhecida, de uma população, então a estimativa sem viés da população “X” é o valor da amostra dividida pela fração. Ou seja:

$$X = x/f,$$

Onde X (maiúsculo) representa a quantidade de interesse, podendo ser um número de objetos, volume, ou qualquer outra coisa de interesse para o estudo. O x (minúsculo) é o valor medido ou estimado da amostra e f é a fração amostral. É importante ressaltar que o valor estimado de X é considerado sem viés somente no caso da amostra ser aleatória e sistemática. A fração f é fácil de obter porque é definida pelo experimentador e o seu valor, depende de um equilíbrio entre a quantidade de trabalho que precisa ser feito e a precisão da estimativa a ser obtida. A fração “f” varia entre 0 e 1. Ela será 1 quando a população inteira dentro do volume definido for contada.

A Figura 2, modificada de West, 2001 ilustra o princípio do fracionador óptico aplicado ao hipocampo e giro denteado.

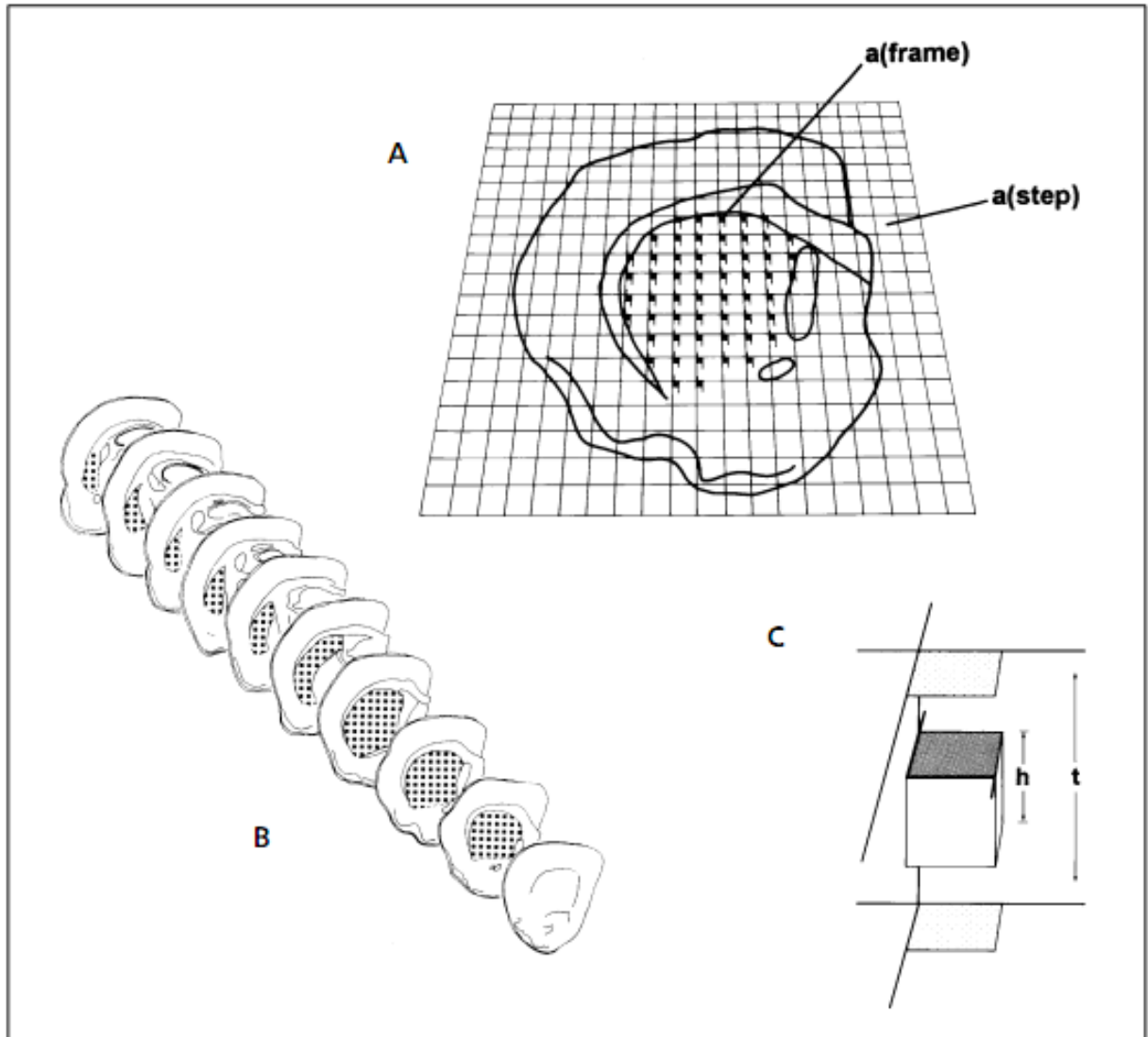


Figura 2. Representação diagramática do fracionador óptico para a estimativa do número total de neurônios que expressam RNAm para somatostatina no estriado do rato (ref). A) amostra sistemática e aleatória de 10-13 seções do estriado são selecionadas para a análise. As seções são selecionadas em intervalos equidistantes, i.e. cada n seção após um início aleatório dentro do primeiro intervalo para assegurar que todas as partes do estriado apresentam a mesma probabilidade de amostragem. As seções selecionadas constituem uma fração conhecida das seções da série, a fração de amostragem das seções (*section sampling fraction*, *ssf*). B) os neurônios marcados são contados em uma fração da área da seção, a fração de amostragem da área (*area sampling fraction*, *asf*). Esta fração corresponde a razão da área da caixa de contagem, a (caixa) (na figura representada pelos retângulos pretos pequenos), pela área associada a cada passo do movimento da lâmina, a (passo) (na figura representada pelos retângulos brancos grandes); $asf = a(\text{passo})/a(\text{caixa})$. C) Os neurônios são contados em um disector óptico posicionado na região central da espessura da seção. A altura do disector óptico (h) constitui uma fração conhecida da espessura da seção (t). A razão h/t representa a fração de amostragem da seção (*thickness sampling fraction*, *tsf*). A área da caixa de contagem, a (caixa), está sombreada. Após a amostragem sistemática em todos os níveis, conta-se diretamente o número de neurônios SQ – em uma fração conhecida da região de interesse sem a necessidade de predições sobre tamanho, forma e orientação de objetos.

Na prática isso é feito através de amostragem sistemática de uma fração conhecida da espessura da secção, tsf (iniciais de “thickness sample fraction”), de uma fração conhecida da área seccional asf (iniciais de “area sample fraction”) e de uma fração conhecida do número de secções que incluem a região de interesse, ssf (iniciais de “section sample fraction”).

Cada análise estereológica começa com o delineamento dos limites da região de interesse em uma série de secções escolhidas de forma aleatória e sistemática (Figura 2) (Howard and Reed, 2005). Em nosso caso os limites arquitetônicos das regiões de interesse podem ser facilmente reconhecidas em secções imunomarcadas para NeuN, ou reagidas para a identificação das redes perineuronais da matriz extracelular utilizando a histoquímica para Wisteria floribunda biotinilada e traçados com auxílio de software dedicado a partir de imagens de vídeo capturadas por videocâmera acoplada ao microscópio e exibidas na tela de um computador utilizando objetivas de baixo aumento (3.2x no presente trabalho).

Para analisar sistematicamente e registrar a ocorrência dos objetos de interesse é necessário mudar para uma objetiva de grande aumento (60x) com elevada abertura numérica e reduzida profundidade de foco (Schmitz and Hof, 2005).

Utilizando essa metodologia não é possível, entretanto, contar todas as células dentro da região de interesse. Para contornar esse dilema e obter estimativas confiáveis (que se aproximam do real) a partir de uma diminuta fração amostral, é necessário a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a terceira dimensão. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em

cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (Schmitz and Hof, 2005).

A partir de critérios arquitetônicos, hodológicos e marcadores seletivos é possível caracterizar sem ambigüidades as áreas e os objetos de interesse utilizando técnicas consagradas (e.g Nissl e Gallyas), imunohistoquímica e histoquímicas específicas e traçadores de alta resolução (e.g. dextrana biotinizada).

1.4.2 Identificação dos Objetos e das Áreas de Interesse no Cérebro Normal e Alterado: Imunohistoquímicas, Histoquímicas Seletivas e Injeção de Traçadores.

Para caracterização de áreas ou núcleos funcionais específicos no sistema nervoso, uma série de critérios são aplicados e foram resumidos em cinco principais abordagens experimentais: estudos arquitetônicos, padrão de conexões, mapeamento topográfico, análise eletrofisiológica de propriedades de neurônios isolados e déficits comportamentais após lesões seletivas reproduzíveis (Phillips et al., 1984). No presente trabalho dois desses critérios foram suficientes para caracterização de CA1, CA2, CA3 e do giro denteado: os padrões arquitetônico e de conexões.

No que concerne ao padrão arquitetônico, empregou-se imunohistoquímica seletiva para identificação de neurônios empregando anticorpos dirigidos contra a proteína nuclear NeuN e histoquímica seletiva empregando a lectina *Wisteria floribunda* para reconhecimento do padrão de distribuição de terminais de açúcares (glicosaminoglicanos) ligados aos proteoglicanos presentes na matriz extracelular.

NeuN é uma proteína nuclear específica de neurônios, expressa no núcleo e parte do citoplasma da vasta maioria de tipos neuronais do sistema nervoso dos vertebrados. Por conta da especificidade de sua expressão ele tem sido referido como um marcador universal do fenótipo neuronal maduro (pós-mitótico) e é usado para distinguir neurônios de células da glia, assim como de outras células que não expressam NeuN (Darlington et al., 2008; Kumar and Buckmaster, 2007). Assim, anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína NeuN do núcleo neuronal, marcam seletivamente o núcleo e parte do citoplasma de neurônios maduros em todas as regiões neurais até então estudadas (Ambrogini et al., 2004; Darlington et al., 2008; Edgar and Rosenblum, 2008; Magavi et al., 2000).

São exceções à regra as células de Purkinje e os interneurônios do cerebelo, as células mitrais do bulbo olfatório, os fotorreceptores da retina, os neurônios da cadeia simpática, e finalmente no gerbil, a substância negra *pars reticulata* (Kumar and Buckmaster, 2007). Na formação hipocampal do camundongo em particular, objeto de interesse do presente trabalho, uma série extensa de estudos confirma essa observação tanto em animais saudáveis quanto em doentes e.g. (Brandt et al., 2003; Clark et al., 2008; Kempermann et al., 2003; Takahashi et al., 2008; von Bohlen Und Halbach, 2007; Zhao et al., 2008). O anticorpo monoclonal empregado no presente trabalho (MAB377, Chemicon, Temecula, CA) dirigido contra o epítipo murino de NeuN reage positivamente em uma variedade de espécies sugerindo que é partilhado por todas elas e isso inclui pássaros, outros roedores e humanos (Kumar and Buckmaster, 2007).

No presente trabalho os ensaios hodológicos empregaram a dextrana biotinilada e a citoarquitetonia utilizou imunomarcagem seletiva da proteína nuclear de neurônios NeuN, e a histoquímica para lecitina *Wisteria floribunda* para marcação de

proteoglicanos da matriz extracelular para definição dos limites de CA1, CA2 e CA3 e dos núcleos septais preenchendo o critério de definição inambígua da área e dos objetos de interesse.

Como marcadores seletivos escolhemos a imunomarcação da proteína ácida fibrilar (GFAP) para astrócitos, a histoquímica com lectina de tomate (*Lycopersicum esculentum*) para a microglia ativada (Boucsein et al., 2000; Kannan et al., 2007; Streit, 2000) e a histoquímica com *Wisteria floribunda* para as redes perineuronais (Bruckner et al., 2003a; Franklin et al., 2008a) de modo a acompanhar a plasticidade fenotípica em forma e número que ocorre com a progressão da doença.

As razões para essa escolha são descritas a seguir.

A matriz extracelular (ME) do tecido nervoso é formada por uma complexa rede de proteínas e carboidratos secretados tanto por neurônios quanto por células gliais e difere da ME de outros tecidos por suas propriedades bioquímicas, composição molecular e complexidade de função (John et al., 2006; Rauch, 1997; Ruoslahti, 1996). Uma das principais especializações da ME no SNC são as Redes Perineuronais (PNNs), presentes em alguns neurônios, e que foram descritas pela primeira vez por Camillo Golgi, ainda no início do século XIX (Golgi, 1989).

As PNNs são compostos agregados de macromoléculas de proteoglicanos (ver Miyata et al., 2005), formadas por proteínas da membrana plasmática associadas à cadeias longas de dissacarídeos (glicosaminoglicanos). A composição das PNNs pode diferir dependendo do tipo neuronal, região cerebral ou mesmo espécie animal a ser considerada (para revisão ver Bandtlow and Zimmermann, 2000). Algumas PNNs são restritas a neurônios inibitórios imunoreativos à parvalbumina no córtex cerebral de roedores (Celio and Blumcke, 1994; Celio and Chiquet-Ehrismann, 1993; Elston et al., 1999; Viggiano, 2000), enquanto que outras

podem ser encontradas em neurônios piramidais no córtex cerebral de marsupiais ou primata (Bruckner et al., 1998; Hausen et al., 1996).

Em todos os casos, as PNNs formam um envelope ao redor do corpo celular e definem um microambiente que se estende aos dendritos proximais e o segmento inicial do axônio. A histoquímica com a lectina *Wisteria floribunda* empregada no presente trabalho marca os terminais de açúcar (glicosaminoglicanos) ligados aos proteoglicanos da matriz extracelular.

No que concerne ao papel funcional das redes perineuronais, recentemente levantou-se as seguintes hipóteses: i) moléculas-guia para axônios em crescimento; ii) concentradoras de fatores de crescimento em microambiente ao redor de certos neurônios; iii) manutenção das relações intercelulares e estabilização das sinapses formadas e iv) integração dos *inputs* sinápticos e propriedades elétricas da membrana (Beneyto et al., 1999; Bruckner et al., 2006; Celio et al., 1998; Hendry et al., 1988; Mulligan et al., 1989; Viggiano, 2000).

No presente trabalho utilizam-se as características da distribuição dos terminais de glicosaminoglicanos da matriz extracelular não só como marcador arquitetônico seletivo para a subdivisão do corno de Amon mas também como um indicador de transformações neuropatológicas que afetam as redes perineuronais da matriz associadas à doença neurodegenerativa crônica. Essa escolha se deveu ao fato de que dados da literatura mostram que tanto os neurônios rodeados pela RP quanto a própria rede são afetados na Doença de Alzheimer e na doença príon e que sua integridade é relevante para preservação dos mecanismos de memória e aprendizado, com papel neuroprotetor contra excitotoxicidade (Okamoto et al., 1994), estresse oxidativo (Morawski et al., 2004) e formação de placas neurofibrilares (Bruckner et al., 1999; Hartig et al., 2001).

A perda de redes perineuronais coincide com a ativação microglial e com a redução da plasticidade sináptica (Franklin et al., 2008b). No hipocampo as redes perineuronais são mais abundantes em interneurônios GABAérgicos dentro ou ao redor da camada de células piramidais do próprio hipocampo, subiculum e pré-subiculum, mas também está bastante distribuída difusamente na neuropila na região de transição entre CA2 e seus vizinhos CA1 e CA3 (Bruckner et al., 2003a).

Do lado das projeções aferentes e eferentes, as amino-dextranas biotiniladas (ADB) podem agir como neurotraçador anterógrado ou retrógrado, ou ambos, dependendo do método, do peso molecular e dos tecidos usados, revelando as vias anatômicas e o detalhamento morfológico de neurônios isolados com árvores axonais e dendríticas de alta resolução (Jiang et al., 1993; van Haeften et al., 1995). As amino dextranas são facilmente fixáveis com o glutaraldeído ou o formaldeído devido à presença de um grupo lisina que pode se ligar covalentemente às moléculas vizinhas. Esse traçador de baixo peso molecular (retrógrado) se distingue do de alto peso molecular (anterógrado), por possuir difusão axonal mais rápida e maior preenchimento dos processos celulares periféricos particularmente da árvore dendrítica (Veenman et al., 1992). Por outro lado injeções de amino-dextrana biotinilada (ADB) de 10 Kd de peso molecular, mostram marcação anterógrada extensiva de axônios e terminais com excelente resolução.

A ADB é transportada por pelo menos 15-20 milímetros em uma semana. Tempos de sobrevivência mais longos podem permitir o transporte por distâncias ainda maiores, mas o tempo de sobrevivência mais longo pode contribuir para uma marcação mais bem definida em distâncias mais curtas, presumivelmente devido ao efeito de acumulação do neurotraçador. O transporte de ADB além de rápido não parece sofrer degradação ao longo do tempo e parece ser efetivo para uma grande

variedade de sistemas de projeção incluindo aqueles dentro do sistema nervoso central (SNC) empregados no presente trabalho (Reiner et al., 2000).

1.5 O MODELO EXPERIMENTAL

Quando da investigação de processos fisiológicos e patológicos que afetam de forma comum o homem e os modelos experimentais tais como as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, cuidado especial deve ser dedicado à escolha do modelo. A neurobiologia do envelhecimento e doenças neurodegenerativas associadas, tem sido uma área onde os modelos murinos, por partilharem com os humanos uma série de similaridades no nível celular e sistêmico, tem dado valiosas contribuições para o estudo das alterações comportamentais e neuropatológicas associadas à doenças neurodegenerativas crônicas do envelhecimento, inclui-se aí a compreensão dos declínios cognitivos subjacentes a partir de ensaios translacionais tendo a doença neurodegenerativa humana como foco (Erickson and Barnes, 2003).

Realmente, durante as duas últimas décadas, camundongos transgênicos com genes familiares da doença de Alzheimer assim como modelos não transgênicos que mimetizam algumas das mudanças neuropatológicas e déficits cognitivos da DA tem sido usados para definir a natureza, a distribuição espacial e a seqüência temporal das alterações celulares, delineando possíveis mecanismos associados às disfunções cerebrais (Yamada and Nabeshima, 2000).

A utilização desses modelos para estudos de neurodegeneração crônica na doença prion em particular tem sido freqüente e no camundongo C57Bl6J produziu uma série extensa de trabalhos investigando a neurobiologia da doença prion

incluindo aspectos comportamentais e neuropatológicos e.g. (Betmouni et al., 1999; Boche et al., 2006; Broom et al., 2007; Cunningham et al., 2003; Felton et al., 2005; Gray et al., 2006; Perry et al., 2002; Picanco-Diniz et al., 2004). Esses resultados são comparados aos do camundongo Suíço albino no presente trabalho.

No que concerne ao camundongo Suíço uns poucos estudos anteriores foram dedicados ao envelhecimento (Davis et al., 1981; Enesco and Samborsky, 1986; Sturrock, 1989; Valzelli et al., 1987). Outros estudos em camundongos adultos dessa variedade investigaram memória espacial e aprendizado (funções cognitivas particularmente afetadas nas doenças neurodegenerativas crônicas induzidas por prion e na DA) utilizando abordagens farmacológicas (Dhingra et al., 2006; Koopmans et al., 2003; Prediger et al., 2008; Rao et al., 2005) mas nenhum deles se deteve nos mecanismos fisiopatológicos da doença neurodegenerativa crônica e alterações comportamentais relacionadas.

A razão para a escolha do camundongo albino Suíço está associado ao fato de que nesse modelo foram realizados muitos dos estudos acerca de infecções induzidas por arbovírus a partir de trabalhos anteriores e.g. (Diniz et al., 2006; Diniz et al., 2008; Gomes-Leal et al., 2006), sendo esse um dos fatores de risco que se investiga presentemente no Lab de Neurodegeneração e infecção em regime de co-infecção com o agente ME7.

Nossa hipótese inicial era de que as áreas alvo das mudanças induzidas pela doença prion nesse modelo seriam as mesmas do modelo C57B/6J mantendo-se a mesma seqüência temporal e os mesmos danos quantitativos ao longo da progressão da doença. Os resultados neuropatológicos e comportamentais revelaram, entretanto, diferenças importantes entre as duas linhagens principalmente quanto às áreas preferenciais do sistema límbico afetadas no início

da doença e ao curso temporal das lesões. Diferente do encontrado na variedade C57Bl6J, o septum e o tálamo foram afetados mais precocemente e com mais intensidade do que a formação hipocampal. Nesse sentido, é interessante mencionar que há evidências em humanos de que a área mais afetada pela doença prion, empregando imunomarcação para a proteína prion, também não é o hipocampo, havendo menores danos hipocampais do que em outras áreas cerebrais (Kaneko et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Implantar como modelo murino de doença prion o camundongo Suíço albino descrevendo as alterações comportamentais e neuropatológicas durante a progressão da doença.

2.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar morfológicamente o hipocampo e o giro denteado normal e alterado pela doença utilizando marcadores histoquímicos para microglia ativada e rede perineuronal, imunohistoquímicos para neurônios e astrócitos e neurotraçador para estudo das principais projeções.

Realizar estudos de algumas das alterações comportamentais, empregando testes previamente empregados na variedade C57Bl6J, correlacionando-as com as alterações neuropatológicas durante a progressão da doença.

Correlacionar os estudos comportamentais com estimativas numéricas sem viés de astrócitos reativos, neurônios, e microglias ativadas do giro denteado e do septum, e das redes perineuronais na região septal, de CA1 e CA3 dos animais doentes em comparação aos controles, utilizando o fracionador óptico e a reconstrução tridimensional.

Comparar o curso temporal da doença e as alterações neuropatológicas com aquelas da variedade C57Bl6J.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto tendo os procedimentos experimentais sido aprovados integralmente (ver anexo).

3.1 ANIMAIS, ANESTESIA E INOCULAÇÃO DOS HOMOGENADOS CEREBRAIS

Foram utilizados 120 camundongos *Mus musculus* variedade albino suíço fêmeas com idade média de 8 semanas de vida, provenientes da colônia do biotério do Instituto Evandro Chagas. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas de dimensões padrão (32x39x16.5cm) com água e comida *ad libitum*, no biotério do Instituto Evandro Chagas com temperatura ambiente de 23°C e ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Outros 20 animais adultos fêmeas foram empregados para estudo comparativo das variedades C57BlJ6 (n=10) e Suíça albina (n=10) com 4 semanas de idade.

Os animais foram anestesiados com triibromoetanol (0,1ml/5g de peso corporal) e submetidos à cirurgia em aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos) para inoculação intracerebral bilateral de 1µl de homogenado cerebral normal ou infectado com o agente ME7. Este último foi obtido de camundongo com sinais clínicos de doença príon terminal. As injeções foram feitas nas coordenadas, +1.3mm da linha interaural, ±2.0mm da linha média, e -2.0mm da superfície do crânio, que

correspondem à CA1 do hipocampo dorsal (Paxinos and Franklin, 2001). Após tricotomia e exposição do crânio através de uma incisão no escalpo foram feitas duas aberturas com o auxílio de uma broca, para permitir a infusão hipocampal bilateral de 1µl do homogenado (10% p/v em salina tamponada com fosfato estéril (PBS)) de cérebro de camundongo normal (**NBH**, n=60) ou de camundongo com sinais clínicos de doença prion (**ME7**, n=60). Após a infusão da suspensão, a agulha era mantida no local por 3 minutos para evitar o refluxo da solução, após os quais era retirada lentamente. O couro cabeludo era então suturado e o camundongo posto em uma gaiola para recuperação. Após o procedimento os animais permaneceram em repouso por cinco semanas antes do início dos testes comportamentais.

Nos quadros 1 e 2 encontram-se relacionados os animais empregados em cada procedimento experimental e áreas de interesse investigadas. A maioria dos ensaios, como se pode constatar, foram realizados na variedade albina Suíça, restringindo-se a alguns ensaios comportamentais à variedade C57Bl6J.

Quadro 2. Animais e Áreas de Interesse Investigadas

	Septum	Corno de Amon		Giro Denteado
		CA1	CA3	
Neu-N	NBH-3;NBH-4;NBH-5; NBH-8 ME7-4(G3);ME7-6(G3);ME7-8(G3); ME7-10(G3)			NBH-3;NBH-4;NBH-5; NBH-8 ME7-1(G2);ME7-2(G2);ME7-3(G2);ME7-6(G2) ME7-4(G3);ME7-6(G3);ME7-8(G3);ME7-10(G3)
<i>Wisteria floribunda</i>	NBH-1;NBH-2;NBH-3;NBH-5 ME7-6(G2);ME7-8(G2);ME7-10(G2);ME7-11(G2) ME7-4(G3);ME7-5(G3);ME7-6(G3);ME7-7(G3)	NBH-1;NBH-2;NBH-3;NBH-6 ME7-1(G2);ME7-6(G2);ME7-8(G2);ME7-10(G2) ME7-4(G3);ME7-5(G3);ME7-6(G3);ME7-7(G3)	NBH-1;NBH-2; NBH-3; NBH-6; ME7-1(G2);ME7-6(G2);ME7-8(G2);ME7-10(G2) ME7-4(G3);ME7-5(G3);ME7-6(G3);ME7-7(G3)	
GFAP	NBH-4;NBH-5;NBH-6;NBH-8 ME7-1(G2);ME7-2(G2);ME7-3(G2);ME7-9(G2);ME7-2(G3);ME7-4(G3);ME7-8(G3);ME7-9(G3)			NBH-4;NBH-5;NBH-6;NBH-9; ME7-2(G2);ME7-4-(G2);ME7-8(G2);ME7-9(G2) ME7-1(G3);ME7-5(G3);ME7-6(G3);ME7-7(G3)
<i>Lycopersicum esculentum</i>	ME7-1(G2);ME7-2(G2);ME7-4(G2);ME7-9(G2);ME7-3(G3);ME7-6(G3);ME7-9(G3); ME7-10(G3)	ME7-1(G2); ME7-2(G2); ME7-4(G2); ME7-9(G2); ME7-1(G3); ME7-7(G3); ME7-9(G3); ME7-10(G3)		ME7-1(G2);ME7-2(G2);ME7-4(G2);ME7-9(G2); ME7-3(G3);ME7-6(G3);ME7-9;ME7-10(G3)

3.2 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

3.2.1 Remoção e Estocagem de Comida (“Burrowing”)

“Burrowing” é uma palavra inglesa que se refere ao comportamento típico de certos roedores de remover e estocar comida a partir de uma toca. Essa atividade quando reduzida revela disfunção hipocampal (Deacon et al., 2001b). Para medir a presença de provável alteração funcional induzida pela doença prion, dez dos animais injetados com homogenado de cérebro normal (NBH) e dez dos injetados com homogenado infectado com prion (ME7) foram utilizados para o teste de burrowing. A toca é simulada por um tubo de PVC de 15 cm de comprimento por 7,2cm de diâmetro, disposto de forma inclinada, com a extremidade elevada a 3 cm do solo e preenchido com 150g de ração peletizada para roedores. Na ocasião do teste os camundongos dos respectivos grupos foram colocados individualmente na gaiola descrita para desenvolverem a atividade de remoção e estocagem dos péletes. Posteriormente o camundongo retornava à sua gaiola coletiva, e a atividade de “burrowing” era medida pesando-se a quantidade de comida remanescente no interior do tubo. Esse procedimento foi realizado duas vezes por semana sempre no mesmo horário (9 às 11h da manhã) por todo o período analisado.

3.2.2 Atividade de Campo Aberto

Após o procedimento do "burrowing" foi avaliado a atividade de campo aberto em uma caixa aberta (30x30x40 cm), com paredes laterais revestidas de fórmica branca. Seu assoalho foi revestido por papel cartão preto, impermeabilizado com papel contacto, dividido em 9 quadrados de tamanhos iguais (3 superiores, 3 médios e 3 inferiores). Cada animal foi colocado individualmente no aparato com a face virada para a parede e permanecia no equipamento por um período de 3 minutos monitorado por um cronômetro. Na atividade de campo aberto avaliamos dois parâmetros, a quantidade de quadrados percorridos e o de levantadas. Estes parâmetros investigados foram registrados manualmente pelo experimentador. Após cada experimento, o instrumento foi limpo completamente com uma solução de etanol a 75% para remover pistas olfatórias deixadas durante o procedimento.

3.2.3 Pontes de Bastão

Utilizado para avaliar a coordenação motora, o aparato era constituído por uma ponte de bastões de madeira de 23 cm de comprimento com bastões espaçados 2 cm um do outro, posta dentro de um recipiente plástico (48x7,5x25cm) contendo uma lâmina d'água, de forma que os bastões ficassem aproximadamente a 2cm acima do nível da água. A gaiola do animal era posicionada em uma das extremidades da ponte e o animal era posto pelo experimentador na extremidade oposta. O tempo levado para percorrer a ponte e o número de erros, registrados a cada vez que uma das patas do animal escorregava ou não alcançava o bastão subsequente, eram conferidos.

3.3 IDENTIFICAÇÃO INAMBÍGUA DAS ÁREAS E OBJETOS DE INTERESSE: ENSAIOS HODOLÓGICOS, ARQUITETÔNICOS, HISTOQUÍMICA SELETIVA E IMUNOMARCAÇÃO.

3.3.1 Injeção e Revelação do Neurotraçador.

Duas semanas antes do sacrifício relacionado a cada janela experimental uma única injeção iontoforética de dextrana biotinilada foi aplicada nos animais do grupo NBH e ME7, no córtex entorrinal lateral ou medial esquerdos e em diferentes regiões do hipocampo (CA1 ou CA3) e giro denteado direitos com a finalidade de avaliar o impacto da doença sobre as características morfométricas de terminais axonais marcados pelo neurotraçador. Os animais selecionados para injeção com dextrana biotinilada foram anestesiados com tribromoetanol (0.1 ml/5g de peso corpóreo i.p.) e fixados em aparelho estereotáxico. Foram feitas por iontoforese injeções de amino dextrana biotinilada a 10% (ADB, Molecular Probes, Eugene, OR) através de micropipetas de vidro, com o diâmetro externo da ponta entre 10-20 μ m. As injeções foram aplicadas segundo coordenadas estereotáticas relativas ao bregma, no hipocampo direito e córtex entorrinal (Área Entorrinal Medial ou Lateral) esquerdo, através de aberturas bilaterais no crânio. O transporte retrógrado ou anterógrado foi obtido por seleção da dextrana biotinilada de baixo ou alto peso molecular respectivamente. Foram empregados pulsos de corrente alternada de +5 μ A de amplitude para promover a difusão do traçador para fora da pipeta, durante 20 minutos com ciclos de ativação e desativação de 7s de duração. Manteve-se a pipeta no sítio de injeção durante 5 minutos após a injeção para permitir a difusão do traçador no parênquima e minimizar

possível refluxo. As coordenadas estereotáticas empregadas foram: antero-posterior - 2mm, médio-lateral ± 1.2 mm e dorso-ventral -2mm para o giro denteado; antero-posterior - 4.5mm, médio-lateral ± 3 mm e dorso-ventral 3.5mm para AEL e antero-posterior - 4mm, médio-lateral ± 3.5 mm e dorso-ventral 4.5mm para AEM. Empregaram-se as referências do Atlas Estereotático para o Camundongo de (PAXINOS, 2001). A verificação da localização do giro denteado e córtex entorrinal e de seus respectivos sítios de injeção se deu pela identificação da laminação clara do hipocampo e do giro denteado assim como pela identificação dos alvos da via perfurante nos casos de injeção no córtex entorrinal. Todos os sítios de injeção no córtex entorrinal foram reconstruídos a partir de cortes paralelos ao plano axial e as secções contendo os terminais axonais marcados foram comparadas às secções axiais do Atlas para o cérebro do camundongo disponibilizado por Williams, 1999, http://www.mbl.org/atlas232/atlas232_frame.html.

Após um período de sobrevivência pós-injeção de duas semanas, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico (tribromoetanol na concentração 0.2 ml/5g de peso corpóreo), por via intra-peritoneal (i.p.) e depois de parada respiratória foram perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada 0.9% por 10 minutos, seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1M, pH7.2-7.4, por 30 minutos. Após craniotomia e retirada do encéfalo, as regiões encefálicas de interesse foram seccionadas em um vibrátomo (Vibratome Sectioning System, Pelco 120), em plano parasagital (hipocampo e giro denteado n=4) ou axial (córtex entorrinal, n=8) em fatias de 100 μ m (n=8) ou 70 μ m (n=4) de espessura. As secções foram recolhidas e incubadas em solução de ABC mais Triton a 5% (Avidin Biotin Complex, Kit Vectastain, Vector) por duas horas, em temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), sob agitação constante.

Após três lavagens de 10 minutos em tampão fosfato 0,1M pH 7.2-7.4, as secções foram transferidas para solução de tampão acetato 0,1M pH 6.0 por 3 minutos e então incubadas na solução GND contendo: 50 mg/ml de sulfato de níquel e amônio; 0,5 mg/ml de 3,3' Diaminobenzidine; 4 mg/ml de β -D-Glucose; 0,8 mg/ml de cloreto de amônio (Sigma). Após 3 minutos acrescentou-se glucose-oxidase (aproximadamente 1mg em intervalos de 10 min). Ao completar 30 minutos a reação foi interrompida com 3 lavagens em tampão fosfato 0.1M pH 7.2-7.4. A seguir as secções submetidas à histoquímica para revelação de dextrana biotinilada foram montadas em lâminas gelatinizadas, eventualmente contracoradas pela técnica de Nissl para a identificação da laminação do hipocampo e do córtex entorrinal e seladas com lamínula utilizando entellan (MERCK).

3.3.2 Sacrifício, Fixação e Corte

Sessenta camundongos oriundos das três janelas temporais (12, 15 e 18 semanas) que receberam injeção intracerebral de NBH ou ME7 após fixação e remoção do cérebro, foram preparados para imunohistoquímica e histoquímica. A fixação se deu após parada respiratória induzida com overdose de tribromoetanol por via transcardíaca. Após perfusão de solução salina heparinizada 0.9% por 10 minutos, seguia-se perfusão de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1M (pH 7.2-7.4) por 30 minutos. Antes da craniotomia o animal era fixado no aparelho estereotáxico para marcação de um dos hemisférios onde era introduzida uma agulha (25x7) utilizando as coordenadas estereotaxicas, tendo como ponto de referência o bregma:0,0mm, na posição médio lateral (ML) -1.5mm, permanecendo por 24 horas no local. Após este

período seguiu-se a retirada do encéfalo, com as regiões de interesse sendo seccionadas em um vibrátomo (Vibratome Sectioning System, Pelco 120) em plano axial ou parasagital em fatias de 70 μ m de espessura.

3.3.3 Imunohistoquímica Seletiva Para Neurônios

Secções dos cérebros dos animais doentes e dos controles foram selecionadas de forma aleatória e sistemática para análise quantitativa da proteína nuclear neuronal (NeuN) tomando-se uma a cada 7 fatias de 100 μ m, e uma a cada 5 fatias de 70 μ m. As secções foram lavadas em tampão fosfato 0,1M e pré-tratadas por 60 minutos em solução de ácido bórico 0,2M pH 9,0 a 70°C. Após lavagem com salina tamponada em fosfato mais Triton 5% (PBST 5%), seguiu-se lavagem de 5 minutos em solução de metanol mais peróxido de hidrogênio 0,3%. Após lavagem em PBS com pH 7.2-7.4, seguiu-se o protocolo “Mouse-On-Mouse Blocking Kit” (Vector Laboratories), que em resumo contém os seguintes passos: as secções são incubadas na solução “MOM IgG blocking” por 60 minutos, lavadas em PBS, e incubadas por 5 minutos no diluente do MOM kit. A incubação no anticorpo primário contra a proteína nuclear NeuN em diluição 1:1000, em PBS 0.1M, pH 7.2-7.4 foi feita por 72 horas, com os cortes flutuando livremente na solução, seguida de lavagem com PBS e incubação no anticorpo secundário biotilado por 12 horas (reagente MOM Biotinylated Anti-Mouse IgG).

Por fim as secções foram lavadas com PBS e incubadas no ABC (Avidin-Biotin Complex, Vector Laboratories) por 30 minutos. A revelação da peroxidase presente nos sítios de ligação antígeno anticorpo foi feita empregando protocolo para intensificação da reação utilizando níquel/glicose oxidase/diamino benzidina (Shu et al., 1988). A

precipitação do cromógeno intensificado pelo níquel se dá após reação enzimática empregando glicose oxidase (enzima para quebra da glicose), β ou α -D-Glicose (substrato) e Cloreto de Amônio (co-fator). Para o preparo da solução de Glicose-Oxidase/Diaminobenzidina/Níquel os passos a seguir foram obedecidos: 1) Solução A: 50mg/ml de sulfato de níquel em tampão acetato 0,2M, pH 6,0. 2) Solução B: 0,5mg/ml de DAB em água destilada. 3) Adicionar A em B e acrescentar 4mg/ml de α -ou β -d-Glicose e 0.8mg/ml de cloreto de amônia à mistura (solução A+B). Após 3 minutos acrescenta-se glucose-oxidase (aproximadamente 1mg/50 ml da mistura) em intervalos de 10 min. Ao completar 30 minutos a reação é interrompida com 3 lavagens em tampão fosfato 0.1M pH 7.2-7.4. Os cortes reagidos para NeuN foram montados em lâminas gelatinizadas, secados à temperatura ambiente e posteriormente desidratados em álcool em várias concentrações (70, 80, 90 e 100%), para então serem diafanizados em xileno e cobertos com Entellan (Merck) e lamínula.

Quadro 3. Passos da reação de imunohistoquímica para detecção do epítipo murino da proteína nuclear Neu-N

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Acido Bórico 0,2M (70 °C pH 9)	1		1
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10	
PBS	3	2	
MOM IgG Block (12 gotas de solução de trabalho + 15ml Mouse Ig Blocking PBS Reagent)	1		1
PBS	3	2	
Solução de trabalho (1200µl de proteína concentrada + 15ml de PBS)	1	5	
Anticorpo primário (Mouse Anti-Neuronal Nuclei) a 4° C na diluição recomendada para Neu-N (1/1000) no concentrado de proteína (15 µl Neu-N + 15ml proteína concentrada).	1		72
PBS	3	5	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG(60µl de Biotinylated IgG em 15 ml da solução de trabalho	1		12
PBS	3	2	
ABC (Complexo Biotina Avidina	1		1
PBS	3	2	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)	1	20	
PB 0,1M	3	5	

3.3.4 Imunohistoquímica para GFAP

A proliferação e ativação de astrócitos em secções fixadas foi avaliada usando o anticorpo primário para proteína ácida fibrilar glial (GFAP). As secções foram reagidas seguindo a seqüência indicada no Quadro 4.

As secções reagidas foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e diafanizadas para posterior análise qualitativa e quantitativa estereológica.

Quadro 4. Passos da reação de imunohistoquímica para detecção da proteína fibrilar ácida GFAP

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Acido Bórico 0,2M (70 °C pH 9)	1		1
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10	
PBS	3	2	
MOM IgG Block (12 gotas de solução de trabalho + 15ml Mouse Ig Blocking PBS Reagent)			1
PBS	3	2	
Solução de trabalho (1200µl de proteína concentrada + 15ml de PBS)	1	5	
Anticorpo primário (4 °C na diluição recomendada para GFAP (1/800) no concentrado de proteína (18,75 µl GFAP + 15ml concentrado de proteína)	1		72
PBS	3	5	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG(60µl de Biotinylated IgG em 15 ml da solucao de trabalho	1		12
PBS	3	2	
ABC (Complexo Biotina Avidina)	1		1
PBS	3	2	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)	1	20	
PB 0,1M	3	5	

3.3.5 Histoquímica para Revelação da Microglia Ativada

A proliferação e ativação da microglia em secções fixadas em paraformaldeído foi avaliada usando a lectina de tomate (*Lycopersicon esculentum*) biotinilada que se liga a resíduos de açúcar do tipo N-acetilglucosamina encontrados na membrana celular da microglia e de vasos sanguíneos em roedores.

As secções foram reagidas na seqüência indicada no Quadro 5. As secções reagidas foram montadas em lâminas gelatinizadas e logo após contraincoradas por Nissl.

Quadro 5. Passos da reação de histoquímica para microglia ativada

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	20	
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	1	20	
Lectina Biotinilada (3 µl sol estoque + 1ml PBS)	1		12
PBS	3	2	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG(60µl de Biotinylated IgG em 15 ml da solução de trabalho	1		12
PBS	3	2	
ABC (complexo Biotina Avidina)	1		1
PBS	3	2	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)		20	
PB 0,1M	3	5	

3.3.6 Histoquímica Para Detecção da Rede Perineuronal

A quantificação da rede perineuronal em secções fixadas em paraformaldeído a 4% foi avaliada usando a Lectina Wisteria floribunda Biotinilada para identificação de resíduos de açúcar da matriz extracelular (Lectina de Wisteria floribunda Sigma). As secções reagidas foram montadas em lâminas gelatinizadas para posterior análise qualitativa e quantitativa

Quadro 6. Passos da reação de histoquímica para detecção da rede perineuronal

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	20	
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	1	20	
Lectina Wisteria floribunda Biotinilada (3 µl sol estoque + 1ml PBS)	1		12
PBS	3	2	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG(60µl de Biotinylated IgG em 15 ml da solução de trabalho	1		12
PBS	3	2	
ABC (Complexo Biotina Avidina)	1		1
PBS	3	2	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)		20	
PB 0,1M	1	5	

3.3.7 Reação de Imunohistoquímica para PrP^{SC}

Para identificação da distribuição topográfica da proteína PrP^C e PrP^{SC} utilizou-se o anticorpo MCA2460 (AbD Serotec) mouse anti-ovine PrP^{SC} na diluição 1:50 em PBS.

Quadro 7. Passos para detecção de imunohistoquímica para PrP^{SC}

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Ácido fórmico 96%	1	30	
Tripsina 0,05%	1	10	
Tampão Citrato 10mM pH 6.0 90°C	1		1
PBS	3	3	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10	
Anticorpo primário (4 °C na diluição recomendada para PrP ^{SC} (1/50) (60µl PrP ^{SC} + 3ml de PBS 01.M)	1		72
Lavagem PBS	3	3	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG (12,5µl de Biotinylated IgG em 10 ml da solução de trabalho	1		12
ABC (Complexo Biotina Avidina)	1		1
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)	1	20	
PB 0,1M	3	5	

Foi necessário a adoção de pré-tratamento para inativação parcial ou total da proteína PrP^C empregando ácido fórmico (85-88%) e tripsina a 0.05% seguido de recuperação antigênica com tampão citrato a 0.1 M pH 6.0 a 90°C durante uma hora. Esse protocolo permite a visualização simultâneas das placas e da proteína prion PrP^C nos corpos celulares de neurônios e de células da glia.

3.3.8 Contracoloração de Nissl

As secções processadas por imunohistoquímica e histoquímica foram montadas para avaliação microscópica e posteriormente contracoloradas para Nissl. A coloração de Nissl utiliza o cresil violeta tingindo núcleos e nucléolos com a coloração violeta. Neurônios e glia são corados indistintamente pela técnica de Nissl. Para preparar a solução de coloração é preciso aquecer o cresil violeta em banho maria a 40°C, agitando-a por 5 minutos; filtrar a solução final em papel filtro; e acrescentar o ácido acético até que o pH da solução esteja entre 3 e 3,5. As fatias devem ser mergulhadas nas soluções em seqüência indicadas no quadro (8)

Quadro 8. Passos da coloração de NISSL

Soluções	Tempo (minutos)
Álcool 100%	05
Álcool 100% + clorofórmio (1/1)	10
Álcool 95%	03
Álcool 75%	03
Água destilada para lavar	0,15
Cresil violeta	01-04
Água destilada para lavar	0,15
Álcool 80 %	03
Álcool 90%	10
Álcool 100% + clorofórmio (1/1)	03
Álcool 95% + ácido acético (15 gtas/100ml)	03
Álcool 95%	06
Álcool 100% + Álcool butírico (1/1)	03
Xileno I	05
Xileno II	05

3.3.9 Avaliação Quantitativa de Neurônios, Astrócitos, Microglia e Redes Perineuronais.

As áreas hipocâmpais após as reações de imunohistoquímica e histoquímica foram registradas por fotomicrografias em baixo, médio e grande aumento (Objetivas 3.2X, 10X; 25X; 60X) acoplado câmera fotográfica (Microfire, Optronics Inc) para captura de imagens a microscópio NIKON Optiphot 2 (Nikon Inc, Japan) através do programa Picture Frame (Microfire, Optronics Inc). Pós-processamento das imagens foi realizado utilizando o programa ADOBE Photoshop CS3 Extended (ADOBE Systems Inc.).

O número total de neurônios, astrócitos, microglia e redes perineuronais foi estimado usando a técnica do fracionador óptico, auxiliada por um sistema de “software” especializado, o StereoInvestigator (MicroBrightField, Williston, VT, US). O “software” controla “hardware” especializado para geração de movimentos de uma platina motorizada de microscópio óptico Optiphot 2 (Nikon Inc, Japan) acionando movimentos nos eixos X-Y-Z do microscópio, ao mesmo tempo em que registra coordenadas tri-dimensionais de pontos que são digitalizados pelo experimentador. Uma câmera de vídeo de alta resolução exibiu simultaneamente as imagens em monitor. Para cada indivíduo todas as primeiras secções de um grupo de secções cobrindo toda a área de interesse foram escolhidas ao acaso, seguindo-se de amostragem sistemática, em secções colhidas a intervalos de 5 ou 7 secções, coletadas de uma série completa da região objeto da estimativa.

Esta seleção resultou em 3 (região septal) ou 7 (giro denteado e hipocampo) secções separadas uma da outra por intervalo regular ao longo da região de interesse de cada indivíduo. Em secções coradas pela técnica de imunohistoquímica (neurônios e astrócitos) e histoquímica (microglia e rede perineural), os limites da região septal, do corno de Amôn (CA1, CA2, CA3) e das camadas molecular, granular e polimórfica do giro denteado foram feitos de acordo com a citoarquitetonia das secções axiais levando em consideração características como intensidade da coloração, tamanho e grau de empacotamento das células assim como a laminação.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o método do fracionador óptico (West et al., 1991) para estimar o número de neurônios, glia e da rede perineuronal em cada subdivisão hipocampal de cada indivíduo, multiplicando-se o número de objetos contados dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependem: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contem a região de interesse (“section sampling fraction”); 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem (“area sampling fraction”); e 3) a altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos (“thickness sampling fraction”). A fórmula aplicada é então:

$$N = \Sigma Q * 1/ssf * 1/asf * 1/tsf.$$

Onde:

N – número total de células;

ΣQ – número de células contadas;

ssf – “section sampling fraction” = secções contadas/total de secções;

asf – “area sampling fraction” = área bloco/área matriz (x,y);

tsf – “tissue sampling fraction” = altura bloco/espessura da secção.

Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (Glaser and Wilson, 1998). Assim, no presente trabalho deu-se preferência ao fracionador óptico como método estereológico e ao coeficiente de Scheaffer como instrumento de medida do erro intrínseco à metodologia.

Utilizando esse coeficiente, definiu-se que a grade e as dimensões da caixa de contagem seriam adequadas quando a relação entre o coeficiente de erro e o coeficiente de variação fosse menor do que 0.5. Um outro parâmetro que se estimou de forma sistemática foi o coeficiente de variação biológica definido como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica) expresso em valor percentual do coeficiente de variação estabelecendo-se que sua contribuição precisa ser sempre maior do que 50% para que se minimize os erros intrínsecos do processo amostral.

Para comparação entre as amostras dos grupos (NBH, ME7 15 (G2) e ME718 (G3), utilizou-se a análise variância ANOVA, com testes *a priori* (Bonferroni), ou teste t bi-caudal definindo-se o nível de significância para diferenças estatísticas em $\alpha < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS E DOS OBJETOS DE INTERESSE: ENSAIOS HODOLÓGICOS E ARQUITETÔNICOS

As figuras de 3 a 7, ilustram fotomicrografias obtidas dos sítios de injeção e áreas de projeção (transporte anterogrado) ou origem (transporte retrogrado) dos neuritos confirmando no camundongo suíço albino o circuito trisináptico básico e principais eferências hipocampais previamente descritas na variedade C57Bl6J. A figura 8 ilustra fotomicrografia da imunomarcação típica com a área de interesse, detalhando laminação e limites arquitetônicos do giro denteado e do hipocampo (imunomarcação seletiva). A projeção das células granulares para CA3 através das fibras musgosas é ilustrada nas figuras 3 e 4 e a marcação dos terços médio e externo da camada molecular a partir de injeções nos córtices entorrinal lateral e medial (a partir de injeções de dextrana biotinilada) nas figuras 5 e 6. A figura 7 completa o circuito indicando as principais áreas alvo das projeções de CA1. Adotamos no presente trabalho a nomenclatura aplicada a variedade C57Bl6J (van Groen et al., 2003).

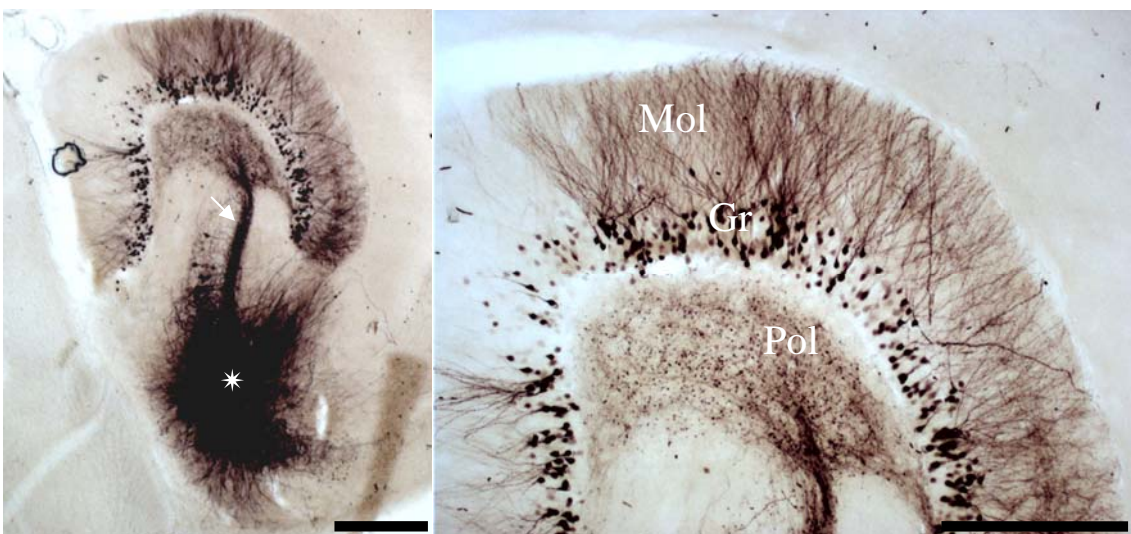


Figura 3. À esquerda fotomicrografia do sítio de injeção em CA3 (asterisco) indicando o feixe de fibras musgosas (seta) originário do transporte retrógrado da ADB de baixo peso molecular. A direita em maior detalhe as células granulares e as camadas do giro denteado. À direita ampliação para visualização de detalhes de parte da região ilustrada no baixo aumento à esquerda. Mol, molecular; Gr, granular; Pol, polimórfica. Escalas: menor aumento 200 μm ; maior aumento: 400 μm

A Figura 4 ilustra sítio de injeção de dextrana biotinilada nas camadas granular e polimórfica do giro denteado com marcação do soma, dos dendritos e dos axônios das células granulares (fibras musgosas) a caminho de CA3.

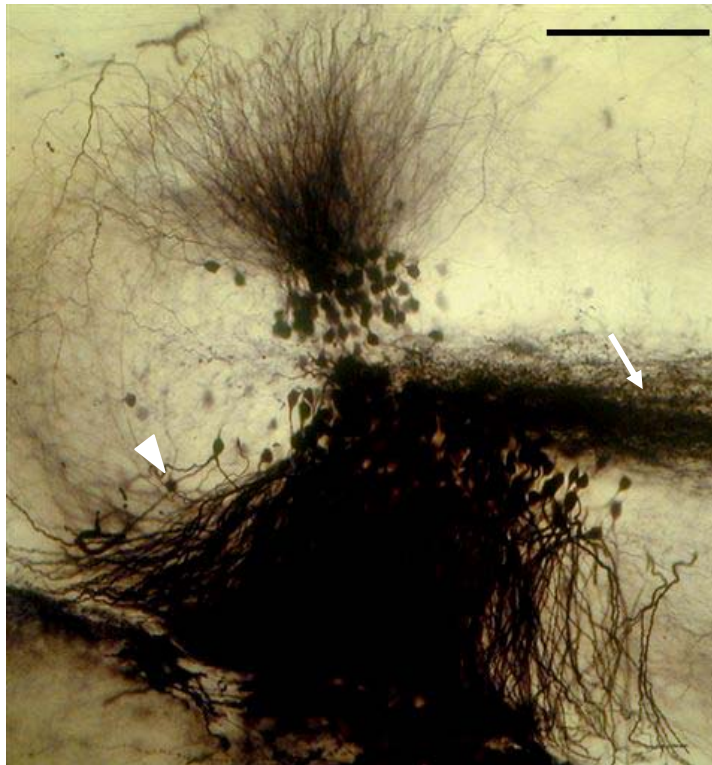


Figura 4: Sítio de injeção no GD, mostrando a marcação por ADB na camada granular. A seta aponta para fibras musgosas marcadas por transporte anterógrado a caminho de CA3, a cabeça de seta aponta para corpo celular de célula granular. Escala 200 μm .

Injeções extracelulares iontoforéticas de dextrana biotinilada restritas ao córtex entorrinal medial ou lateral, objeto de publicação previamente submetida (Santos-Filho et al., 2009), revelaram densa projeção ipsilateral por transporte anterógrado com detalhes morfológicos de alta resolução. Uns poucos terminais axonais foram detectados no hipocampo e giro denteado contralateral. Apenas nos sítios de injeção o padrão de marcação é compatível com a presença de transporte retrógrado com coleção de corpos

celulares e fibras, marcados intensamente, ocupando todas as camadas do MEA e LEA (Figura 5). As injeções foram restritas às camadas II e III em todos os casos. Os axônios descendentes deixam o sítio de injeção, passam através da substância branca subjacente e entram no feixe angular presumivelmente em direção a níveis mais rostrais do córtex entorrinal, hipocampo e subículo.

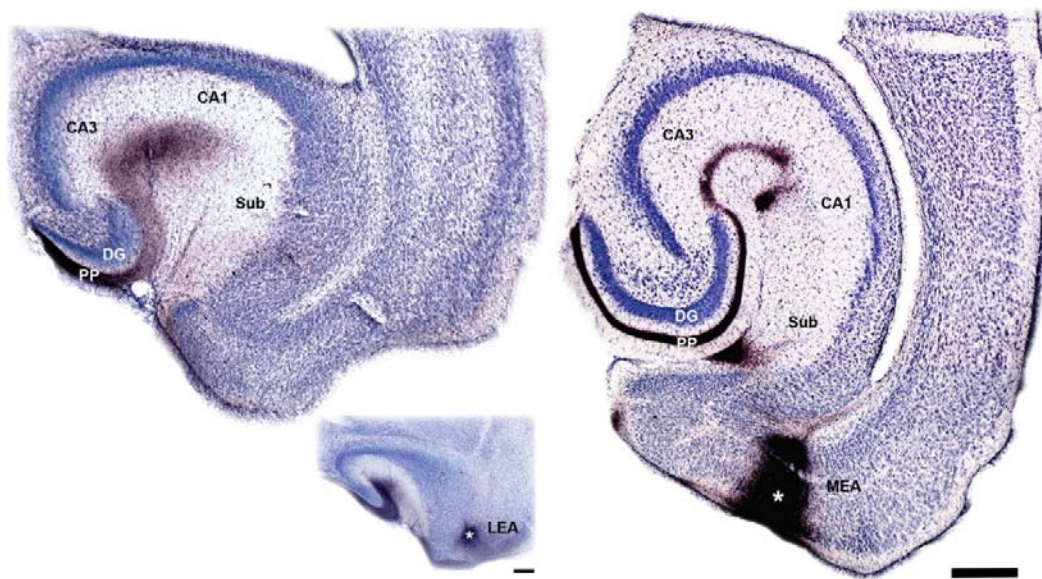


Figura.5. Fotomicrografias em baixo aumento de secções horizontais do cérebro de fêmea adulta do camundongo suíço albino ilustrando os sítios de injeção nos córtices entorrinal lateral (a esquerda) e medial (a direita). Como esperado detectou-se focos de marcação em CA1, CA3 e no subiculum assim como nos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado. MEA – Área entorrinal medial; LEA – Área entorrinal lateral; PP – Via perforante; Escala: 250µm, (Direita); Adaptado de (Santos-Filho et al., 2009)

Uma única injeção de dextrana biotinizada nas camadas II e III na região lateral do córtex entorrinal medial (n=4) promove a marcação de focos de projeção no estrato lacunoso molecular de CA1 e CA3 e na camada molecular da região subicular, mas primariamente marca o terço médio da camada molecular do giro denteado (Figura 5 à direita). Por outro lado uma única injeção na região caudal do córtex entorrinal lateral (n=4)

marca primariamente não só o terço externo da camada molecular do giro denteado, mas também CA1, CA3 e o subículo (Fig 5 à esquerda).

Na figura 6E ilustra-se um axônio da via perfurante medial e seus botões de passagem e terminal.

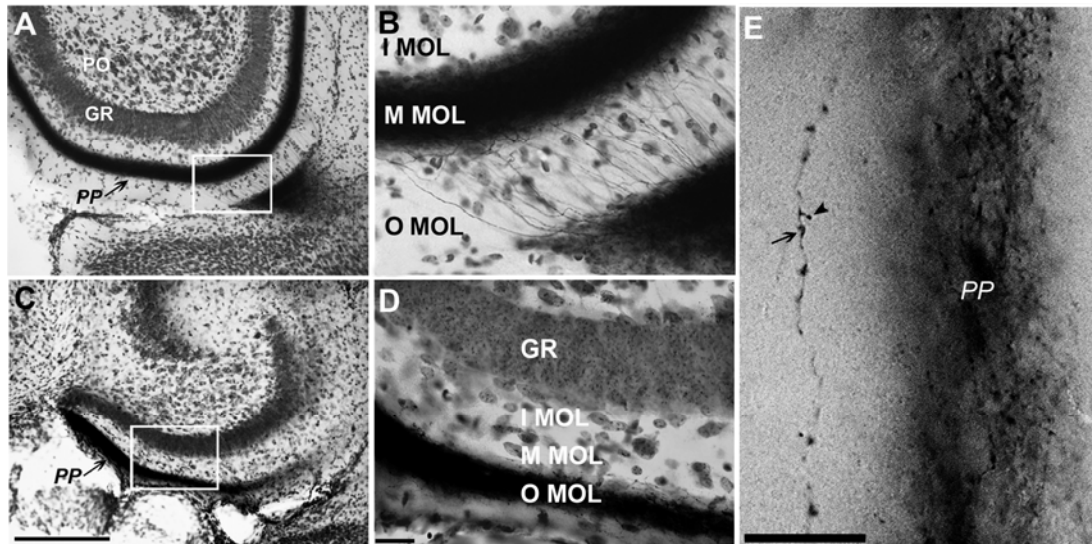


Figura.6. Fotomicrografias em baixo (A, C), médio (B, D) e grande aumento (E) de secções horizontais do cérebro do camundongo albino ilustrando as camadas (coloração de Nissl) e as fibras marcadas pelo transporte de dextrana biotinilada a partir do córtex entorrinal. As regiões dentro do quadrado branco (A, C) são ampliadas em B e D para ilustrar as terminações nos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado. Em E, fotomicrografia em alto ganho de um fragmento de axônio isolado ilustrando botões de passagem (seta) e botão terminal (cabeça de seta) MEA – Área entorrinal medial; LEA – Área entorrinal lateral; PP – Via perfurante; IMOL – terço interno da camada molecular; MMOL – terço médio da camada molecular; OMOL – terço externo da camada molecular; GR – camada granular; PO – camada polimórfica. Escala: E, 250 μ m. Adaptado de (Santos-Filho et al., 2009)

Na Figura 7 ilustram-se as projeções de CA1 empregando dextrana biotinilada de alto peso molecular. As projeções ilustradas nas Figuras 3 a 7 completam os critérios hodológicos para caracterização das áreas de interesse que foram objeto de estimativas estereológicas (septum, camada polimórfica e CA1).

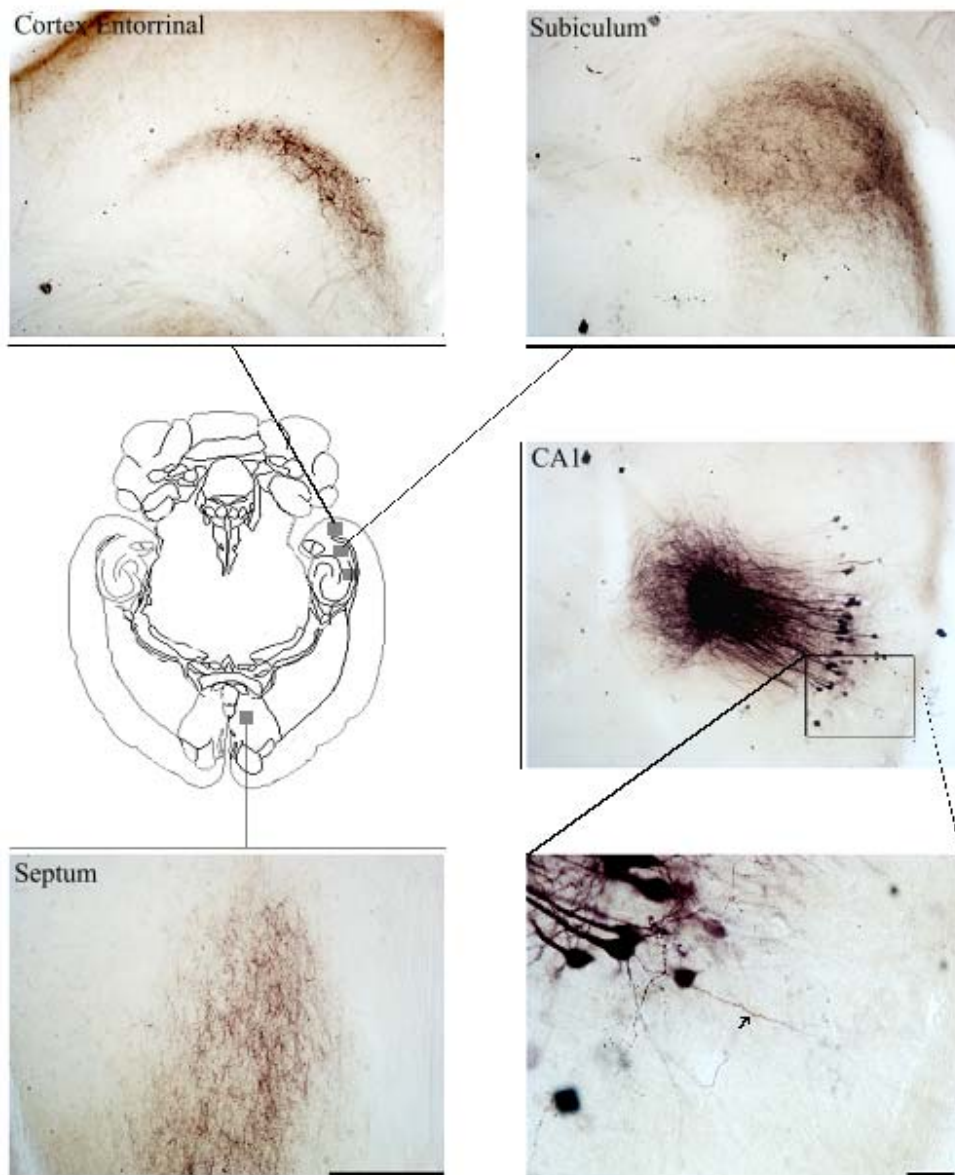


Figura.7 Fotomicrografias dos sítios das projeções de CA1 (sítio de injeção) duas semanas após injeção iontoforética de dextrana biotilada em fêmea adulta do camundongo albino Suíço. São ilustrados os focos de marcação anterógrada encontrados no Septum, no Córtex Entorrinal e no Subiculum. A seta na figura em grande aumento ilustra projeção axonal em direção à camada oriens. Escalas: maior aumento 25 μ m; menor aumento 250 μ m

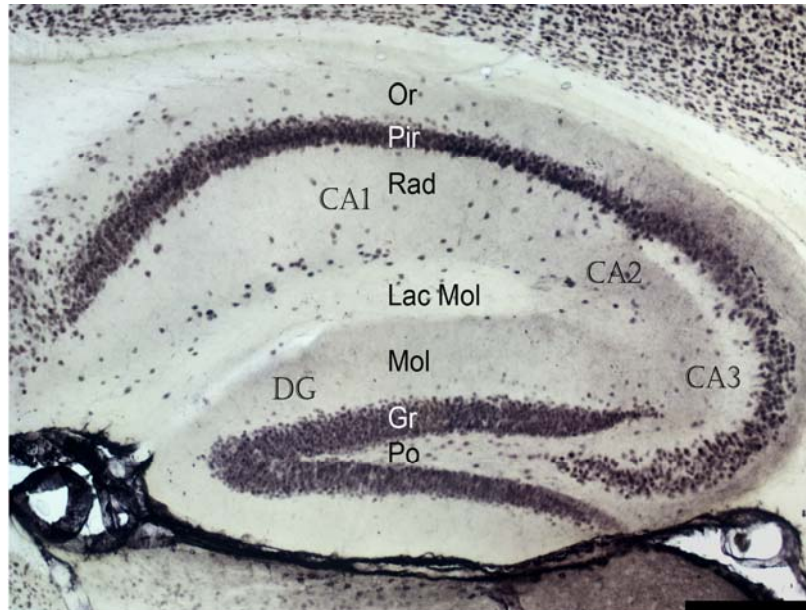


Figura. 8. Fotomicrografia de secção submetida à imunomarcagem seletiva para proteína nuclear NeuN em fatia do giro dentado e parte do hipocampo dorsal (CA3 e CA2) de fêmea adulta do camundongo da variedade suíça albina. Or, oriens; Pir, piramidal; Rad, radiatum; Lac Mol, lacunosum molecular; Mol, molecular; Gr, granular; Po, camada polimórfica. Escala: 500µm

A figura 8 é fotomicrografia em baixo aumento ilustrando a imunomarcagem para Neu-N escolhida para garantir a contagem de neurônios preenchendo o requisito da identificação inambígua do objeto de interesse. O limite arquitetônico entre as regiões CA1/CA2 e CA3 podem ser identificados com relativa facilidade por imunomarcagem em função da variação do empacotamento e do tamanho dos neurônios marcados em cada região. Os corpos celulares marcados em CA3 parecem maiores e distribuídos de forma menos empacotada do que os de CA1/CA2. A distinção entre CA1 e CA2 é entretanto mais difícil de ser feita com imunomarcagem por Neu-N tendo-se que utilizar a histoquímica para *Wisteria floribunda* como marcador arquitetônico de CA2 para garantir a distinção dos limites entre os dois (Figura 9). A Figura 9 ilustra em baixo aumento (A) os limites arquitetônicos entre CA1 e CA2 e entre CA2 e CA3 e em grande aumento os detalhes das redes perineuronais revelados pela histoquímica para identificação de resíduos de açúcares (terminais do tipo

n-acetil galactosamina) da matriz extracelular empregando a lectina *Wisteria floribunda* marcada com biotina. Denominou-se de tipo I a rede com marcação mais extensa e intensa envolvendo o soma, dendritos proximais (primários) e distais (secundários e terciários) e de tipo II a rede restrita ao soma e dendritos primários e com marcação menos intensa.

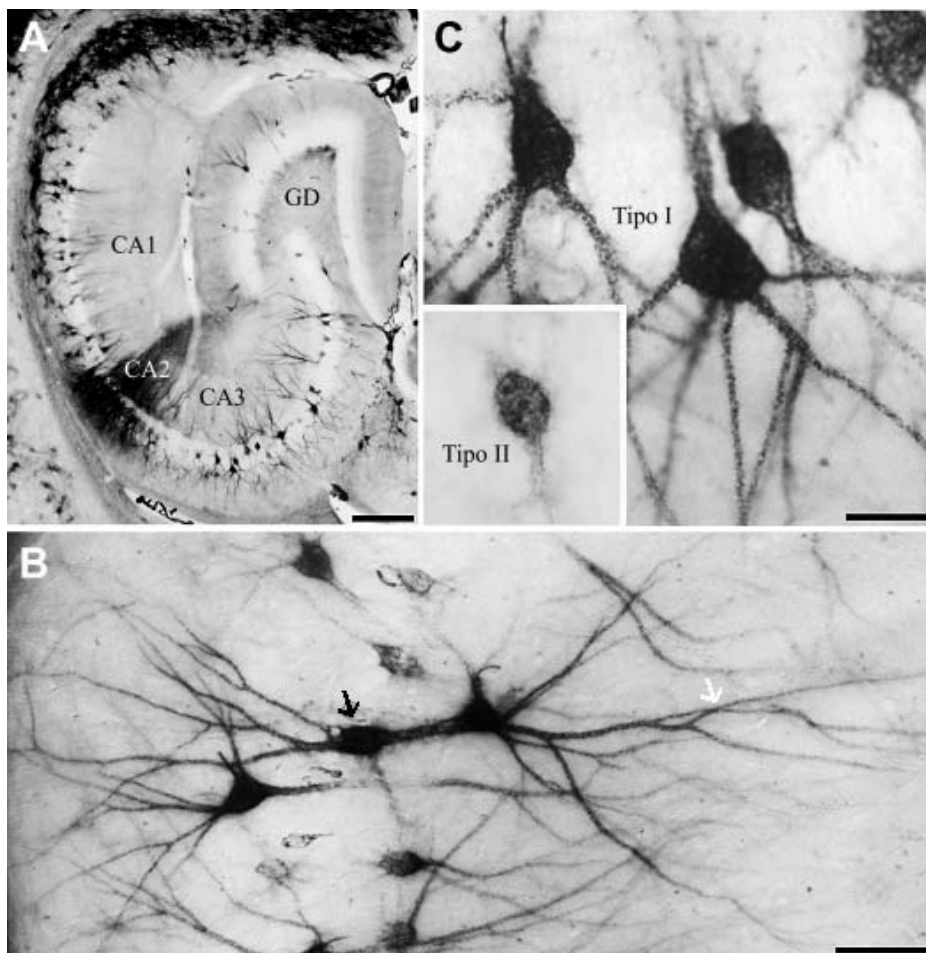


Figura 9. Fotomicrografias em baixo (A), médio (B) e grande aumento (C) para ilustrar a arquitetura do hipocampo e do giro denteado, a extensão e os tipos de redes perineuronais em secção do cérebro de um animal sadio. Notar a clara distinção entre os campos hipocámpais CA1, CA2 e CA3 (A), a extensão da rede envolvendo o soma (seta preta) e ramos dendríticos (seta branca) de neurônios hipocámpais de CA3 (B) e a distinção entre os tipos I e II de redes perineuronais (C) a partir da histoquímica para detecção de resíduos de açúcar da matriz extracelular com a lectina *Wisteria floribunda* biotinizada. Escalas A; 250µm; B; 25 µm; C: 50 µm.

A identificação das redes perineuronais através da Wisteria floribunda biotinilada permitiu portanto a definição clara dos campos hipocampais, e do septum medial e lateral assim como a distinção entre os dois tipos de redes.

Tomados os resultados em conjunto foi possível caracterizar com precisão os limites das áreas e identificar-se sem ambigüidades os objetos de interesse.

4.2. ACHADOS NEUROPATOLÓGICOS

4.2.1 Análise qualitativa

4.2.1.1. Microglia Ativada e Astrocitose Reativa

As Figuras.10 e .11 são painéis dedicados a ilustrar as regiões de microglia ativada e astrocitose mais intensas em secções provenientes de animais que representam a média das estimativas estereológicas e que foram sacrificados 15 e 18 semanas após a injeção intrahipocampal do agente ME7 em CA1. Os ensaios realizados 12 semanas após a inoculação com o agente infectante não detectaram diferença apreciável em relação ao animal inoculado com o homogenado cerebral normal. Notar a ativação microglial e astrocitose reativa intensas na região septal e na camada polimórfica do giro denteado, e em menor intensidade em CA3, sobretudo nas secções oriundas de animais sacrificados 18 semanas após a inoculação. A microgliose e a astrocitose reativa nessas janelas temporais foram proporcionalmente mais intensas na maioria

dos casos na região septal seguida da camada polimórfica do giro denteado e em menor proporção em CA3 no hipocampo.

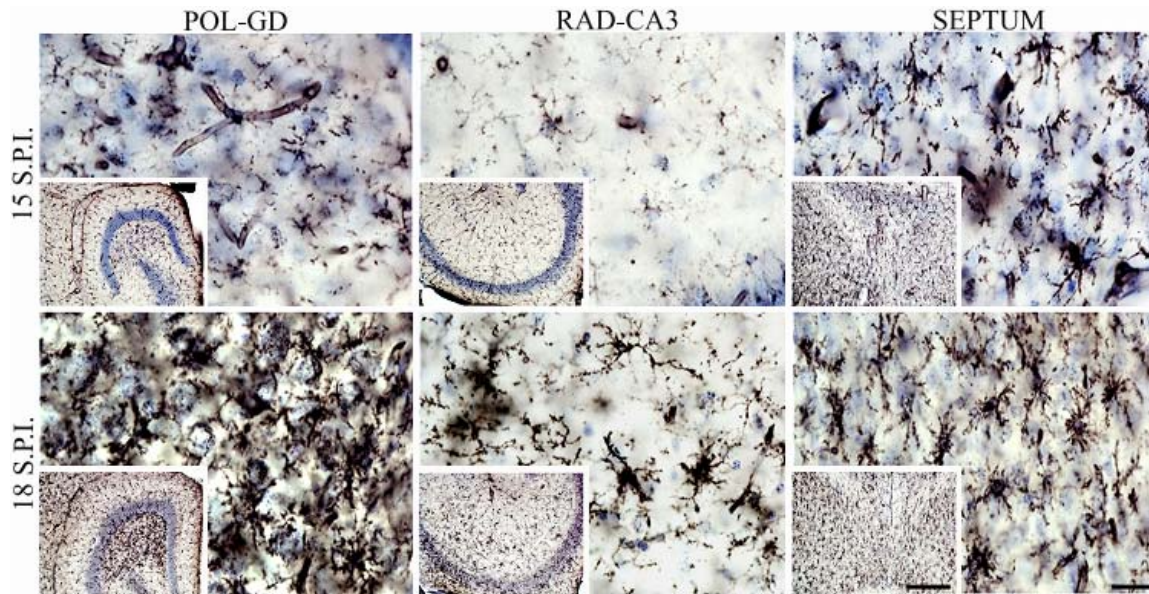


Figura.10 Fotomicrografias de secções reagidas por histoquímica para lecitina *Lycopodium esculentum* biotinilada, contracoradas pelo Nissl para detecção de microglias ativadas nas camadas polimórfica do giro denteado, radiatum de CA3 e septum medial para ilustrar o estado de ativação na 15^a (linha superior) e 18^a (linha inferior) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar a maior ativação no septum e na camada polimórfica do giro denteado em comparação a CA3. Escalas; baixo aumento: 250µm; grande aumento: 25µm

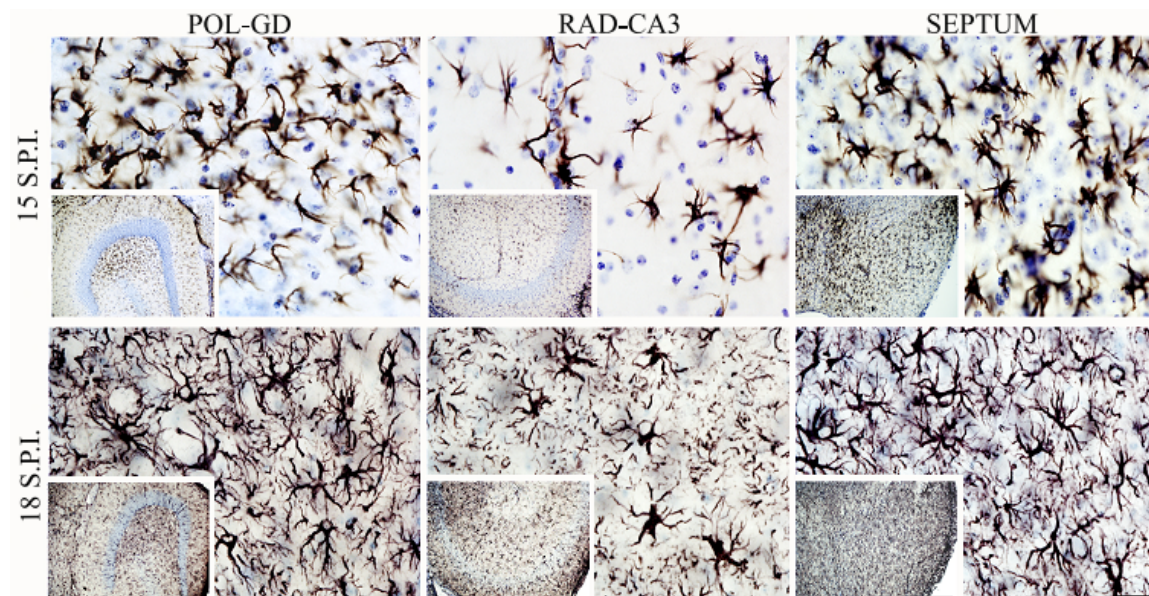


Figura.11 Fotomicrografias de secções reagidas por imunohistoquímica para proteína ácida fibrilar, contracoradas pelo Nissl, para detecção de astrócitos reativos nas camadas polimórfica do giro denteado, radiatum de CA3 e septum medial para ilustrar o número de astrócitos reativos 15 (linha

superior) e 18 (linha inferior) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar a maior imunomarcção no septum e na camada polimórfica do giro denteado em comparação a CA3. . Escalas; baixo aumento: 250µm; grande aumento: 25µm

4.2.1.2 Redes Perineuronais

Na Figura 12 são ilustradas as alterações da matriz extracelular em CA1, CA3 e na região septal, 15 e 18 semanas após a injeção do agente ME7 em CA1. Os ensaios realizados 12 semanas após a inoculação com o agente infectante não detectaram diferença apreciável em relação ao animal inoculado com o homogenado cerebral normal.

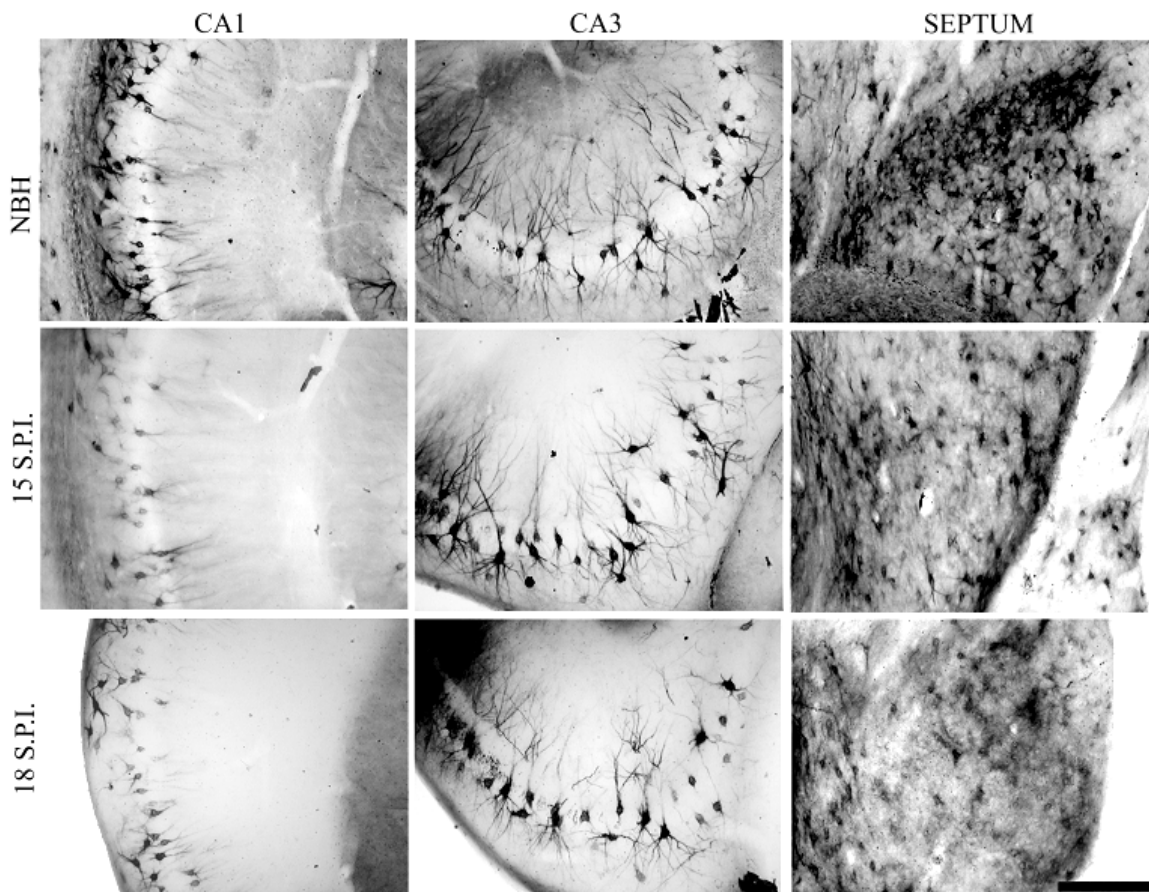


Figura.12 Fotomicrografias em baixo aumento de secções provenientes de animais controle (NBH), e infectados com o agente ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação do homogenado cerebral. Notar a

redução da atividade histoquímica da matriz extracelular em CA1 (coluna à esquerda), CA3 (coluna central) e septum (coluna à direita) nos animais infectados pelo agente ME7, após a 15^a (linha central) e a 18^a (linha inferior) semanas em comparação à reatividade da matriz da secção proveniente do animal inoculado com homogenado cerebral não infectado (NBH) (linha superior). NBH – homogenado cerebral normal; S.P.I. – semanas pós-inoculação. Escala: 250µm.

A perda aparente de redes perineuronais na 18^a é maior do que na 15^a semana e o septum parece ter a maior perda proporcional quando comparado a CA1 e CA3 tomando como referência áreas equivalentes nos respectivos controles. Essas alterações das redes perineuronais da matriz extracelular parecem restritas às mesmas regiões onde se detectou a ativação da microglia e de astrócitos reativos e a redução observada nas redes foi tanto mais intensa quanto maior a frequência de microglias ativadas e astrócitos reativos (Figuras 10 e 11). A camada polimórfica do giro denteado não é ilustrada pelo fato de que as redes perineuronais normalmente não estão presentes nessa camada. Para comparação com outras regiões do hipocampo, que são normalmente alvo da neurodegeneração crônica induzida pela doença prion no camundongo C57Bl6J documentamos as alterações das redes em CA1 e CA3 no camundongo Suíço ilustrando que ainda que haja menor ativação nessas regiões ainda é possível detectar o impacto sobre as redes nessas regiões.

Coerente com as observações qualitativas as estimativas estereológicas para cada um dos marcadores apresentadas a seguir revelaram diferenças estatísticas significativas entre os animais controle e os infectados em todas as regiões submetidas à contagem em proporções distintas. São exceção a essa regra as estimativas do número de neurônios que não apresentaram diferenças em nenhuma das regiões contadas.

4.2.1.3 Terminais Axonais

A Figura 13 ilustra fotomicrografias de secções contendo axônios musgosos pertencentes à projeção que tem origem nas células granulares do giro denteado e se destina às células piramidais de CA3 de um animal infectado pelo agente ME7 e de um animal do grupo controle (NBH). Ambos receberam injeção iontoforética de dextrana biotinilada de alto peso molecular (para transporte anterógrado) na camada granular do giro denteado na 16ª semana após a injeção dos homogenados intracerebrais e foram sacrificados na 18ª semana. A análise qualitativa das fibras axonais revela diferenças marcadas no padrão de enchimento dos botões e das fibras axonais musgosas nos animais ME7 e NBH.

As imagens das fibras do animal do grupo ME7(G3) são sugestivas de extravasamento do traçador para o espaço extracelular, com intensificação da marcação em muitas fibras com bordas mal definidas e botões tumefeitos, alternadas por regiões de redução da marcação sugerindo diminuição do preenchimento da fibra pelo traçador. Por outro lado as fibras axonais do grupo controle têm limites e botões bem definidos, marcação homogênea ao longo do eixo axonal, sem irregularidades na área ou forma dos botões que aparecem completamente livres de tumefação ou extravasamento do traçador.

Coerentemente esses achados coincidem com a ativação microglial mais intensa da camada polimórfica do giro denteado, região por onde muitas das fibras musgosas trafegam em direção a CA3. É possível que essas observações reflitam possíveis alterações no mecanismo de transporte axoplasmático do traçador contribuindo para o

acúmulo da dextrana biotilada em regiões deficientes ou destituídas dos mecanismos de transporte.

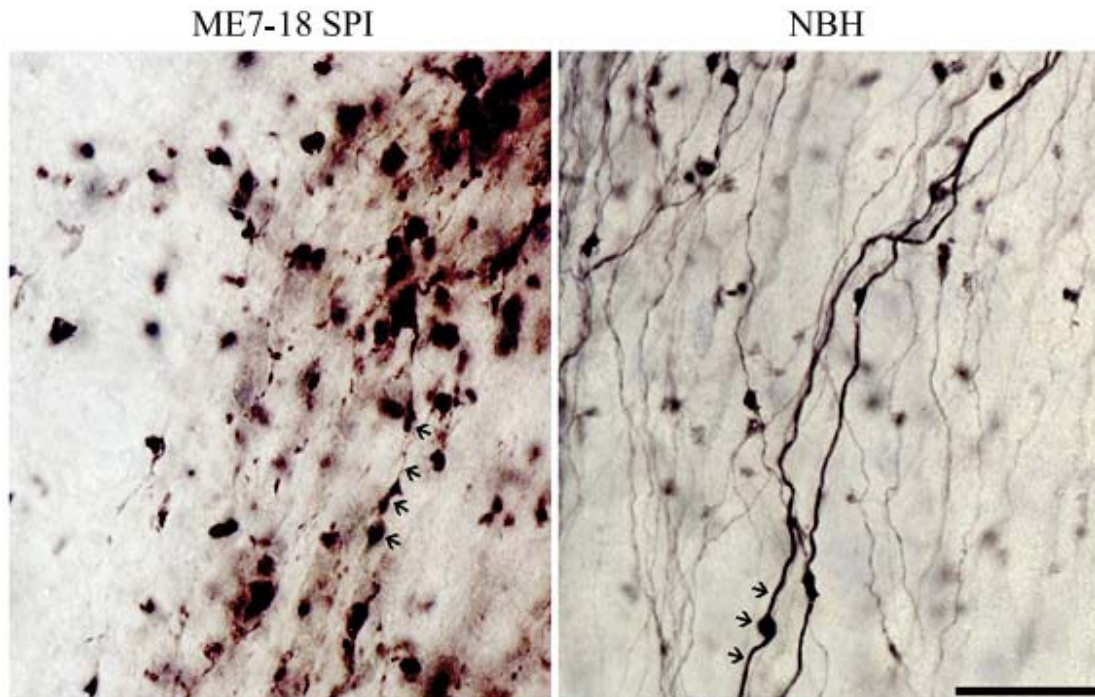


Figura.13. Fotomicrografias das fibras musgosas de animal infectado pelo agente ME7(ME7-18 SPI) e de animal do grupo controle (NBH). As setas em ambas as figuras destacam trecho de uma fibra marcada para ilustrar botões tumefeitos e marcação irregular do axônio no animal doente e marcação homogênea com contornos bem definidos das fibras e dos botões no animal controle. Escala:

4.2.1.4 Vacuolização e Depósitos Amilóides: PrP^C e PrP^{SC}

A Figura 14 contém fotomicrografias para ilustração dos processos de deposição da proteína PrP^{SC} no espaço extracelular formando placas e vacuolização no *stratum radiatum* do Corno de Amon 1 em animal infectado pelo agente ME7, 18 semanas após a inoculação. Notar a presença de células imunopositivas para a proteína PrP^{SC} no centro das placas amilóides (provavelmente microglias) e a deposição de fibrilas em torno da placa após inativação parcial da proteína PrP^C. A inativação da proteína PrP^C utilizando ácido fórmico, proteases e recuperação antigênica empregando calor,

confirmaram a ocorrência de depósitos amilóides PrP^{SC} positivos na ausência da proteína PrP^C.

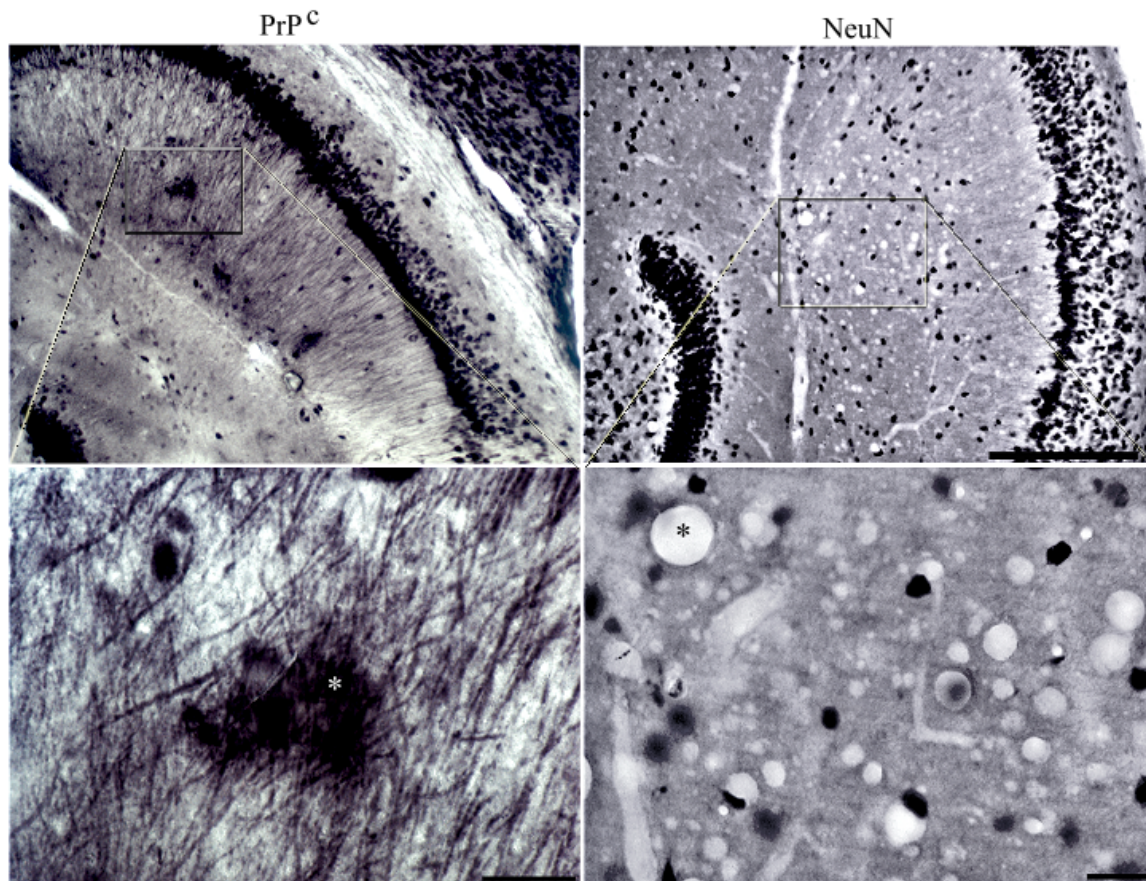


Figura.14. Fotomicrografias da região CA1 de secções do hipocampo de um animal ME7 sacrificado 18 semanas após a inoculação. A esquerda imunomarcção para a proteína PrP^{SC}, com inativação parcial da proteína PrP^C por tripsina e a direita imunomarcção para Neu-N ilustrando vacúolos no parênquima do hipocampo ventral. (*) indicam placa amilóide à esquerda e vacúolo à direita Escalas: baixo aumento 250 μ m; grande aumento 25 μ m.

4.2.2. Análises Quantitativas Pelo Fracionador Óptico

4.2.2.1 Microglia Ativada

Região Septal

Para fins de contagem a região septal foi definida como a região compreendida entre a linha média, a comissura anterior e o núcleo anterior do bulbo olfatório em sua porção mais ventral e a região compreendida entre a linha média o corpo caloso e a fímbria em sua porção mais dorsal.

As tabelas 01 e 02 indicam respectivamente os parâmetros para contagem e os resultados das estimativas realizadas para a microglia ativada na região septal na 15ª e na 18ª semanas após a inoculação do homogenado cerebral contaminado com o agente ME7. A contagem de microglias na região septal e na camada polimórfica do giro denteado revelou a presença de intensa marcação desde a 15ª semana, com acréscimo significativo daquelas na 18ª semana (teste t bi-caudal para amostras independentes $p < 0.05$).

Tabela. 01. Parâmetros Experimentais e Número de Microglias Ativadas contadas (ΣQ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suiço, Sacrificados na 15ª (G2) ou na 18ª (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X, Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	ΣQ
ME7-1G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.86 ± 0.01	1/5	127	3	199
ME7-4G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.53 ± 0.04	1/5	113	3	115
ME7-2G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.71 ± 0.10	1/5	106	3	146
ME7-9G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.71 ± 0.05	1/5	105	3	198
ME7-3G3 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.70 ± 0.03	1/5	119	3	385
ME7-6G3 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.68 ± 0.02	1/5	115	3	437
ME7-9G3 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.63 ± 0.08	1/5	101	3	233
ME7-10-6G3 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.74 ± 0.02	1/5	108	3	371

⁽¹⁾Área da caixa de contagem, *a(caixa)*; dimensões de X, Y, *A(X, Y)* ; *asf*, fração amostral da área da grade [*a(caixa)*/*A(X, Y)*]; *tsf*, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: *h/espessura da secção*; *ssf*, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μ m).

A análise comparativa entre as estimativas do número total de microglias ativadas na 15ª e na 18ª semanas, na região septal, revelou aumento expressivo

do número médio de 10503 (± 1255) na 15ª, para 23405 (± 5282) na 18ª semana (Teste t bi-caudal para amostras independentes $p < 0.0016$).

Tabela 02. Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15ª(G2) ou na 18ª(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
ME7-1G2	15.2 \pm 0.30	10454	0.08
ME7-4G2	25.2 \pm 1.88	9869	0.09
ME7-2G2	19.54 \pm 3.17	9416	0.08
ME7-9G2	19.0 \pm 1.52	12274	0.07
Média	19.7 \pm 2.06	10503	0.08
D.P.		± 1255	
$CV^2 = (D.P./Média)^2$		0.0144	
CE^2		0.0064	
CE^2/CV^2		0.44	
CVB^2		0.0080	
CVB^2 (% of CV^2)		55.5%	
ME7-3G3	19.14 \pm 0.91	24512	0.07
ME7-6G3	19.54 \pm 0.75	29596	0.07
ME7-9G3	22.0 \pm 2.51	16797	0.07
ME7-10G3	17.84 \pm 0.35	22715	0.07
Média	19.63 \pm 0.87	23405	0.07
D.P.		± 5282	
$CV^2 = (D.P./Média)^2$		0.050	
CE^2		0.005	
CE^2/CV^2		0.10	
CVB^2		0.045	
CVB^2 (% of CV^2)		90%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).⁽¹⁾ Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções.⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μ m).

Não foi possível constatar nos animais inoculados com o homogenado cerebral normal a presença inambígua de microglia ativada empregando a

histoquímica para *Lycopersicum esculentum*, razão pela qual esses animais não são tomados como referência para comparação quantitativa.

Camada Polimórfica do Giro Denteado

Na camada polimórfica do giro denteado igualmente se observou diferenças significativas nas estimativas do número total de microglias entre a 15^a e a 18^a semanas subseqüentes à inoculação do agente ME7, com acréscimo de cerca de 60% na ativação microglial. A tabela 03 trás os parâmetros utilizados na contagem dessa camada e a tabela 04 os números das estimativas obtidas pelo fracionador óptico.

Tabela 03. Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Microglia Ativada (ΣQ) na camada polimórfica do giro denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X, Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	ΣQ
ME7-1G2 ⁽²⁾	40 x 40	80 x 80	0,25	0.94 ± 0.08	1/5	185	6	262
ME7-4G2 ⁽²⁾	40 x 40	80 x 80	0,25	0.65 ± 0.07	1/5	109	6	151
ME7-2G2 ⁽²⁾	40 x 40	80 x 80	0,25	0.71 ± 0.03	1/5	148	6	220
ME7-9G2 ⁽²⁾	40 x 40	80 x 80	0,25	0.91 ± 0.08	1/5	144	6	206
ME7-3G3 ⁽²⁾	45 x 45	80 x 80	0,32	0.88 ± 0.03	1/5	194	6	627
ME7-6G3 ⁽²⁾	45 x 45	80 x 80	0,32	0.86 ± 0.03	1/5	195	6	486
ME7-9G3 ⁽²⁾	45 x 45	80 x 80	0,32	0.92 ± 0.02	1/5	214	6	493
ME7-10-6G3 ⁽²⁾	45 x 45	80 x 80	0,32	0.93 ± 0.02	1/5	195	6	327

⁽¹⁾Área da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Em números absolutos a análise comparativa entre as médias das estimativas do número total de microglias ativadas na camada polimórfica revelou aumento do número médio de 5374 (\pm 870 d.p.) na 15^a, para 8618 (\pm 2307 d.p.) na 18^a semana (Teste t bi-caudal para amostras independentes $p < 0.05$). Não foi possível igualmente constatar nos animais inoculados com o homogenado cerebral normal a

presença de microglia ativada na camada polimórfica, razão pela qual esses animais não são tomados como referência para comparação quantitativa.

Tabela 04. Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
ME7-1G2	14.01 ± 0.13	5599	0.07
ME7-4G2	21.7 ± 2.50	5055	0.10
ME7-2G2	18.7 ± 0.80	6450	0.08
ME7-9G2	13.89 ± 0.27	4393	0.08
Média	17.1 ± 1.90	5374	0.08
D.P.		± 870	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.026	
CE^2		0.0064	
CE^2/CV^2		0.25	
CVB^2		0.0196	
CVB^2 (% of CV^2)		75.4%	
ME7-3G3	14.89 ± 0.49	11228	0.05
ME7-6G3	15.33 ± 0.66	9130	0.06
ME7-9G3	14.2 ± 0.38	8474	0.05
ME7-10G3	14.13 ± 0.27	5639	0.07
Média	14.64 ± 0.29	8618	0.06
D.P.		± 2307	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.073	
CE^2		0.004	
CE^2/CV^2		0.055	
CVB^2		0.069	
CVB^2 (% of CV^2)		94.52%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

Corno de Amon 1 (CA1)

Com o intuito de avaliar a ativação microglial em CA1 de modo a compará-la com as da região septal e da camada polimórfica, estimamos o número total de microglias nos animais ME7 dos grupos G2 e G3. A tabela 05 trás os parâmetros utilizados na contagem de CA1 e a tabela 06 os números das estimativas obtidas pelo fracionador óptico.

Tabela 05. Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Microglia Ativada (ΣQ) em CA1 de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X, Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	ΣQ
ME7-1G2 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.83 ± 0.03	1/5	179	6	375
ME7-4G2 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.65 ± 0.07	1/5	180	6	269
ME7-2G2 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.61 ± 0.02	1/5	184	6	253
ME7-9G2 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.91 ± 0.01	1/5	185	6	482
ME7-1G3 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.89 ± 0.02	1/5	179	6	435
ME7-7G3 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.77 ± 0.03	1/5	187	6	379
ME7-9G3 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.78 ± 0.02	1/5	195	6	485
ME7-10-6G3 ⁽²⁾	60 x 60	120 x 120	0,25	0.93 ± 0.02	1/5	219	6	378

⁽¹⁾Área da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [$a(\text{caixa})/A(X, Y)$]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Tabela 06. Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) em CA1 de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço com Coeficiente de Erro (CE) para os Animais dos

Grupos Sacrificados na 15^a(G2) ou na 18^a(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
ME7-1G2	15.91 ± 0.73	5599	0.05
ME7-4G2	24.6 ± 2.20	9888	0.05
ME7-2G2	21.42 ± 0.68	8325	0.05
ME7-9G2	14.35 ± 0.16	10699	0.05
Média	19.07 ± 2.39	8628	0.05
D.P.		2247	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0676	
CE^2		0.0025	
CE^2/CV^2		0.037	
CVB^2		0.0651	
CVB^2 (% of CV^2)		96.3%	
ME7-1G3	14.62 ± 0.35	9794	0.05
ME7-7G3	17.15 ± 0.83	10270	0.06
ME7-9G3	16.88 ± 0.42	12443	0.05
ME7-10G3	20.34 ± 0.35	11752	0.06
Média	17.25 ± 1.18	11065	0.055
D.P.		± 1241	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0125	
CE^2		0.0030	
CE^2/CV^2		0.242	
CVB^2		0.0095	
CVB^2 (% of CV^2)		76%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Área da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

Embora as diferenças encontradas nas estimativas do número de microglias em CA1 nos animais dos grupos 2 e 3 não tenham sido significantes (teste t bicaudal para amostras independentes $p>0.05$) comparamos o estado de ativação microglial entre a 15^a e a 18^a semanas nas áreas CA1, região septal e camada polimórfica do giro denteado empregando um índice relativo. Para isso calculamos o contraste entre as estimativas médias dos grupos G2 e G3 definido como: C=

$(E18 - E15)/(E18 + E15)$, onde: C= Contraste; E18 = Estimativa na 18ª semana; E15 = Estimativa na 15ª semana. A escolha de índice relativo deveu-se ao fato de que as regiões eleitas para contagem possuem diferentes áreas, volumes e possivelmente número de microglias residentes (não ativadas), tornando os números absolutos, difíceis de comparar. Como o índice de contraste avalia razões entre as estimativas médias do número de microglias ativadas de cada janela temporal dentro de cada área, pode-se comparar os resultados de forma direta. Além disso, o contraste é número adimensional (que varia entre 0 e 1) que normaliza as escalas definindo taxas de ativação que podem ser comparadas prontamente.

Os valores médios das estimativas do número total de microglias e desvios padrão correspondentes aos grupos de animais ME7G2 (n=4) e ME7G3 (n=4) em CA1 foram respectivamente 8628 ± 2247 e 11065 ± 1241 , (teste T bi-caudal, duas amostra independentes $p=0.10$) ao contrario do que se observou para as regiões septal e polimórfica (Figura.15). Essa é uma das diferenças que distingue o padrão neuropatológico do modelo Suíço albino do padrão do modelo C57Bl6J onde as alterações mais intensas e precoces são encontradas em CA1 (Cunningham, 2005; Cunningham et al., 2003).

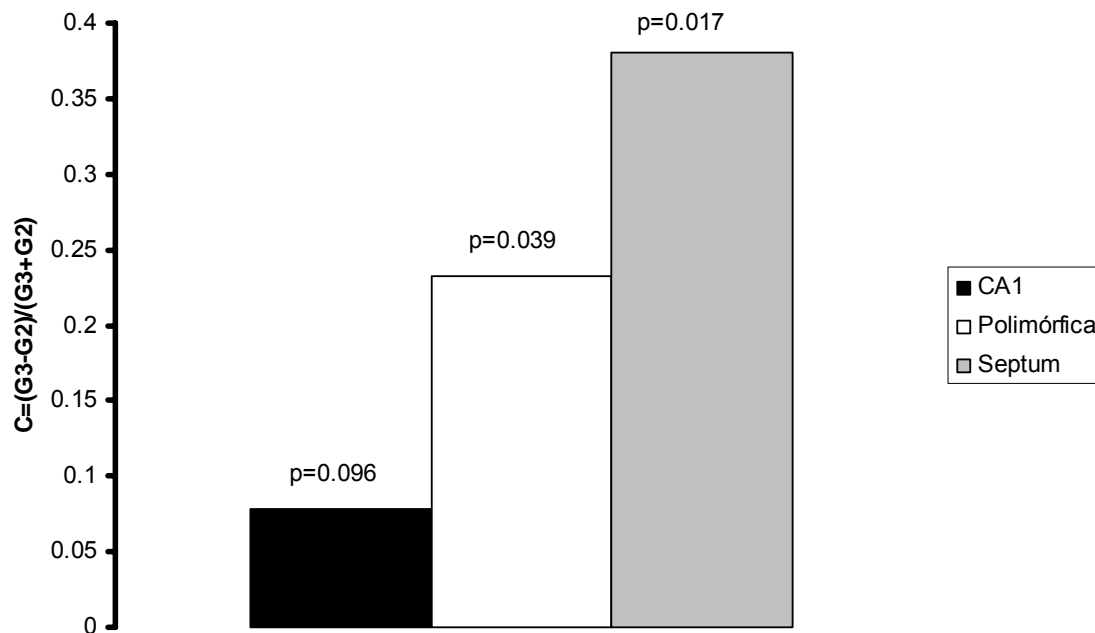


Figura.15. Taxas de ativação microglial calculada pelo índice de contraste entre as estimativas do número total de microglias 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar que a maior taxa de ativação ocorre no septum e a menor em CA1. Diferenças estatísticas significantes foram definidas para valores de $p < 0.05$.

4.2.2.2. Rede Perineuronal

Região Septal

A tabela 07 ilustra os parâmetros de contagem e o número de redes contadas por animal, e a tabela 08 as estimativas do número total na região septal em animais sacrificados, 15 e 18 semanas após as inoculações em comparação ao grupo NBH (Figura 16). A análise estereológica das redes perineuronais da região septal revelou diferenças significativas (ANOVA, um critério, teste *a priori* de Bonferroni $p < 0.05$) entre os diferentes grupos experimentais (Tabelas 7 e 8).

Tabela 07. Parâmetros Experimentais e Número de Redes Perineuronais contadas (ΣQ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15ª (G2) e na 18ª (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7 e respectivos controles (NBH)⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	ΣQ
ME7-6G2 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.93 ± 0.003	1/5	112	3	131
ME7-8G2 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.90 ± 0.01	1/5	118	3	146
ME7-10G2 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.89 ± 0.01	1/5	123	3	227
ME7-11G2 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.83 ± 0.03	1/5	140	3	186
ME7-4G3 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.91 ± 0.004	1/5	154	3	102
ME7-7G3 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.89 ± 0.02	1/5	103	3	81
ME7-5G3 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.91 ± 0.03	1/5	112	3	149
ME7-6G3 ⁽²⁾	70 x 70	120 x 120	0,34	0.95 ± 0.01	1/5	144	3	206
NBH-1	70 x 70	120 x 120	0,34	0.87 ± 0.03	1/5	163	3	349
NBH-2	70 x 70	120 x 120	0,34	0.88 ± 0.01	1/5	147	3	356
NBH-5	70 x 70	120 x 120	0,34	0.85 ± 0.09	1/5	188	3	275
NBH-3	70 x 70	120 x 120	0,34	0.89 ± 0.002	1/5	165	3	255

⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção; h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

É possível constatar do conjunto de dados que uma redução do número de redes perineuronais já está presente na região septal 15 semanas após a inoculação do agente ME7 e que essa alteração parece ser progressiva, uma vez que ocorre redução adicional significativa do número de redes 18 semanas após a inoculação, coincidindo com o acréscimo do número de microglias na mesma região.

Tabela 08. Estimativa Individual Unilateral do Número de Redes Perineuronais (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15ª(G2) e na 18ª(G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 e respectivos controles (NBH)⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
ME7-6G2	21.5 ± 0.06	2055	0.07
ME7-8G2	22.3 ± 0.26	2386	0.12
ME7-10G2	22.62 ± 0.27	3794	0.09
ME7-11G2	24.09 ± 0.98	3303	0.09
Média	22.18 ± 0.24	2884	0.09
D.P.		± 804	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.08	
CE^2		0.008	
CE^2/CV^2		0.1	
CVB^2		0.072	
CVB^2 (% of CV^2)		90%	
ME7-4G3 ⁽²⁾	21.94 ± 0.09	1643	0.12
ME7-7G3 ⁽²⁾	22.48 ± 0.58	1357	0.16
ME7-5G3 ⁽²⁾	22.19 ± 0.85	2403	0.10
ME7-6G3 ⁽²⁾	21.0 ± 0.10	4060	0.07
Média	21.90 ± 0.32	2354	0.11
D.P.		± 1190	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.25	
CE^2		0.01	
CE^2/CV^2		0.04	
CVB^2		0.24	
CVB^2 (% of CV^2)		96%	
NBH-1	23.2 ± 0.08	5931	0.08
NBH-2	22.7 ± 0.27	5939	0.06
NBH-5	23.6 ± 0.27	4852	0.08
NBH-3	22.5 ± 0.07	4255	0.07
Média		5244	0.07
D.P.		834	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.026	
CE^2		0.005	
CE^2/CV^2		0.2	
CVB^2		0.021	
CVB^2 (% of CV^2)		80.77%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

A equação da reta $Y = aX + b$ aplicada às estimativas obtidas pelo fracionador óptico para G2 e G3 antecipa um valor de intersecção com o eixo dos X em torno de 35.700 microglias, quantidade essa que reduziria a zero o número de redes perineuronais da região septal se a relação entre número de microglias e o de redes perineuronais se comportasse de forma linear a medida que a doença progride.

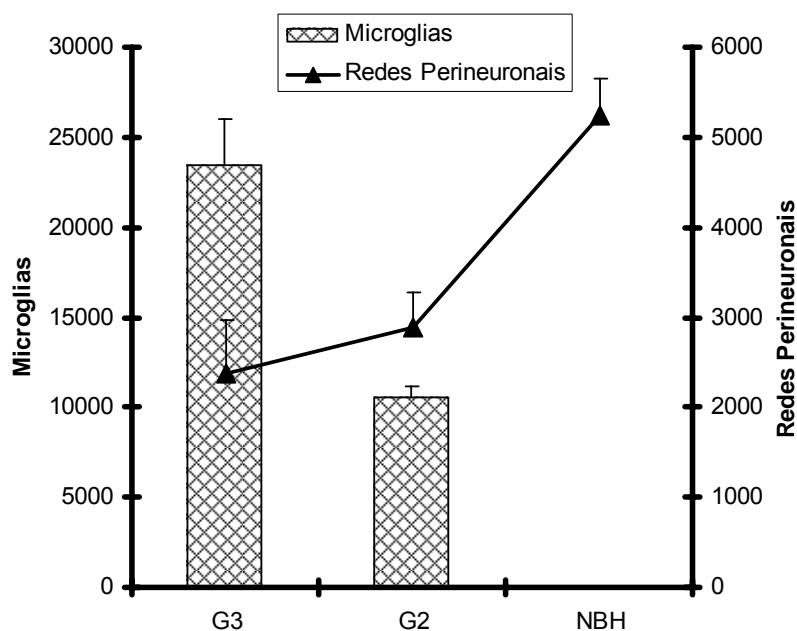


Figura.16. Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de microglias ativadas (à esquerda) na região septal dos animais inoculados com o agente ME7, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação ao animal inoculado com homogenado cerebral normal (NBH). Não se detectou a presença de microglias ativadas nos animais controles (NBH).

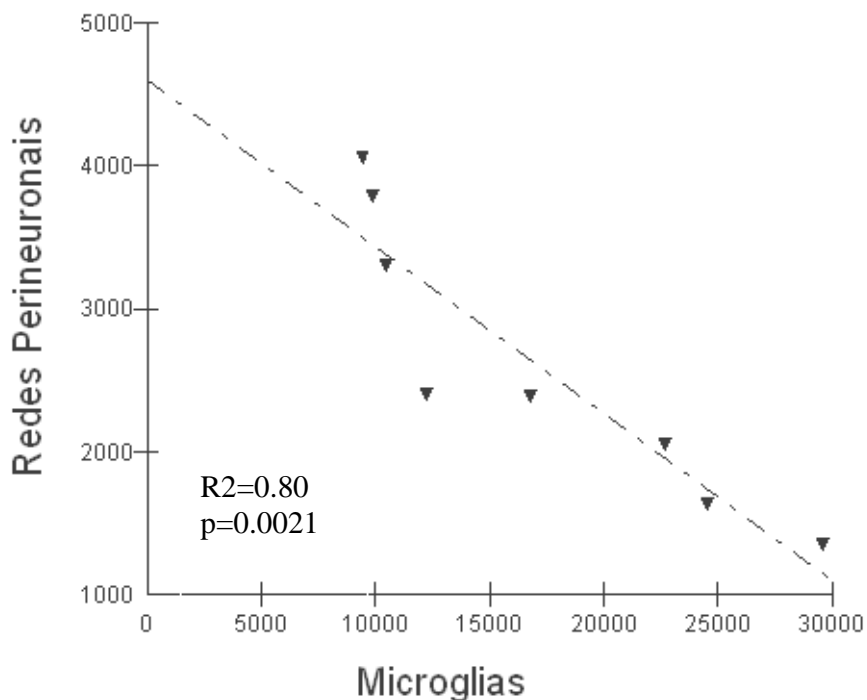


Figura.17. Representação gráfica da curva de regressão linear para estimativas quantitativas envolvendo microglias ativas e redes perineuronais na região septal medial e lateral de animais infectados pelo agente ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação.

A comparação entre o número de microglias ativas e o número de redes perineuronais em CA1, 15 e 18 semanas após a injeção intrahipocampal em CA1(Figura18), indica que embora a ativação microglial e o número de redes perineuronais não tenham revelado diferença estatística significativa entre G2 e G3 ($p>0.05$), o número médio de redes dos animais infectados com o agente ME7 é significativamente menor do que os do grupo NBH ($P<0.05$). Esse achado revela que a ativação microglial em relação à população quiescente, não estimada no presente trabalho foi suficiente para promover a alteração da matriz extracelular nas janelas temporais estudadas.

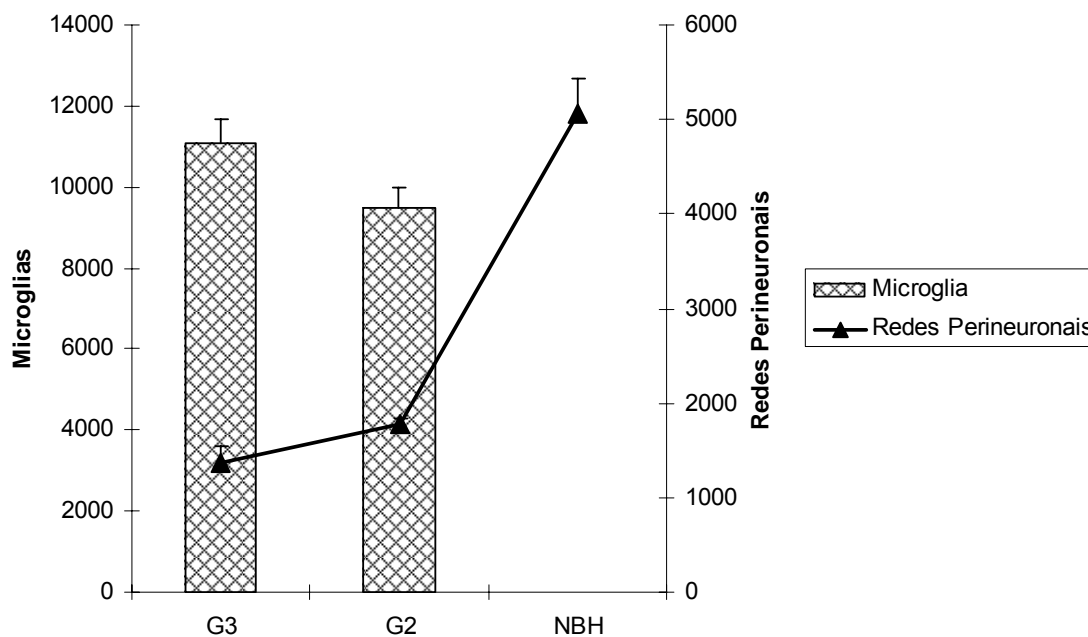


Figura.18. Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de microglias ativadas (à esquerda) em CA1 dos animais inoculados com o agente ME7, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação ao animal inoculado com homogenado cerebral normal (NBH). Não se detectou a presença de microglias ativadas nos animais controles (NBH).

4.2.2.3 Astrócitos

Região Septal

As tabelas 09 e 10 indicam os parâmetros para contagem e os resultados das estimativas realizadas para os astrócitos reativos na região septal para o grupo controle (NBH), para a 15ª (ME7-G2) e 18ª (ME7-G3) semanas após a inoculação do homogenado cerebral normal ou contaminado com o agente ME7.

A análise comparativa entre as estimativas do número total de astrócitos reativos na 15ª e na 18ª semanas na região septal (Figura 20) revelou aumento expressivo do número médio: de 11422 (\pm 2265) na 15ª para 17030 (\pm 1276) na

18ª semanas, em ambos os casos significativamente maiores do que o número encontrado (8458 ± 1010) nas mesmas camadas no grupo NBH (ANOVA, um critério, Bonferroni, $p < 0.0025$).

Tabela 09. Parâmetros Experimentais e Número de Astrócitos Reativos contados (ΣQ^+) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15ª (G2) ou na 18ª (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾

Animais	a(caixa) (μm^2)	A(X, Y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	No de Caixas	No de Secções	ΣQ^+
NBH-4	40 x 40	120 x 120	0,11	0.59 ± 0.02	1/5	126	3	108
NBH-6	40 x 40	120 x 120	0,11	0.50 ± 0.02	1/5	101	3	99
NBH-8	40 x 40	120 x 120	0,11	0.62 ± 0.04	1/5	105	3	91
NBH-5	40 x 40	120 x 120	0,11	0.52 ± 0.09	1/5	137	3	101
ME7-3G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.52 ± 0.01	1/5	87	3	119
ME7-1G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.56 ± 0.05	1/5	88	3	151
ME7-2G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.47 ± 0.03	1/5	134	3	148
ME7-9G2 ⁽²⁾	40 x 40	120 x 120	0,11	0.79 ± 0.02	1/5	111	3	149
ME7-1G3	40 x 40	120 x 120	0,11	0.62 ± 0.02	1/5	111	3	207
ME7-5G3	40 x 40	120 x 120	0,11	0.58 ± 0.03	1/5	131	3	223
ME7-6G3	40 x 40	120 x 120	0,11	0.51 ± 0.03	1/5	123	3	190
ME7-7-6G3	40 x 40	120 x 120	0,11	0.53 ± 0.003	1/5	149	3	205

⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [$a(\text{caixa})/A(X, Y)$]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: $h/\text{espessura da secção}$; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Assim, da mesma forma que para a microglia a análise estereológica aplicada aos astrócitos reativos na região septal, revelou a presença de astrocitose desde a 15ª semana pós-inoculação que se agrava na 18ª semana. Os testes estatísticos comparando os resultados obtidos para os 3 grupos experimentais confirmam astrocitose crescente durante a progressão da doença com diferenças significativas entre as médias dos grupos (ANOVA, um critério, teste de Bonferroni *a priori* $p < 0.025$).

Tabela 10. Estimativa Individual Unilateral do Número de Astrócitos Reativos (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos controle (NBH), 15^a(G2) e 18^a(G3) semanas Sacrificados após a Inoculação do Agente ME7 ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
NBH-4	26.6 ± 0.95	8291	0.10
NBH-6	26.6 ± 1.16	8833	0.11
NBH-8	21.6 ± 1.14	7157	0.13
NBH-5	26.4 ± 3.82	9552	0.12
Média		8458	0.11
D.P.		1010	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0144	
CE^2		0.0121	
CE^2/CV^2		0.84	
CVB^2		0.0021	
CVB^2 (% of CV^2)		14.8%	
ME7-3G2	25.54 ± 0.85	10569	0.12
ME7-1G2	24.15 ± 2.17	12681	0.10
ME7-2G2	27.93 ± 1.55	13768	0.10
ME7-9G2	16.61 ± 0.46	8669	0.12
Média		11422	0.11
D.P.		2265	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.04	
CE^2		0.01	
CE^2/CV^2		0.25	
CVB^2		0.03	
CVB^2 (% of CV^2)		75%	
ME7-1G3	25.5 ± 0.8	15227	0.06
ME7-5G3	23.1 ± 1.2	18036	0.05
ME7-6G3	26.26 ± 1.81	17038	0.05
ME7-7G3	25.05 ± 0.14	17819	0.07
Média	23.96 ± 1.07	17030	0.0675
D.P.		± 1276	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0056	
CE^2		0.0045	
CE^2/CV^2		0.067	
CVB^2		0.0011	
CVB^2 (% of CV^2)		19.7%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

Da Tabela 10, entretanto, diferente das situações anteriores a relação $CE^2/CV^2 < 0.5$, no caso dos astrócitos reativos da região septal dos animais controle, a relação $CE^2/CV^2 > 0.5$ sugerindo um valor de coeficiente de erro inaceitável.

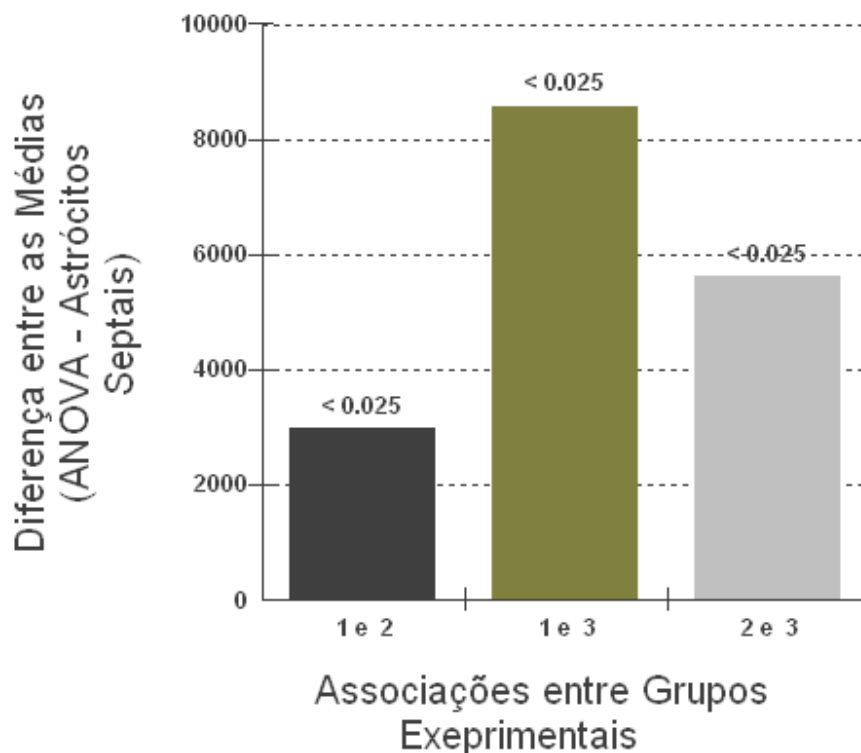


Figura 19. Diferença entre as médias estimadas para os astrócitos da região septal medial dos grupos NBH(1), G2 (2) e G3 (3). Notar que com a progressão da doença a diferença entre o número estimado de astrócitos dos animais infectados e do controle cresce.

Entretanto, como a análise de variância revelou diferenças estatísticas significativas entre as médias dos grupos, (ANOVA, um critério, teste *a priori* de Bonferroni, $p < 0.0025$) figura 19, e as contribuições do coeficiente de erro e da variação biológica representam respectivamente 11 e 15% da variação total, a regra geral $CE^2/CV^2 < 0,5$ não é útil e não pode ser aplicada por introduzir interpretações sem significado (Slomianka and West, 2005).

O que se pode interpretar acerca da contribuição dos erros metodológicos intrínsecos nesses casos é de que no caso limite os erros metodológicos intrínsecos não foram suficientes para obscurecer as diferenças biológicas estimadas. Essa mesma linha de raciocínio se aplica igualmente às estimativas do número de astrócitos da região septal para o grupo ME7-G3 onde o coeficiente de erro é de apenas 6.7% e a variação biológica de 19.7%.

Tal como ilustrado para microglia é útil compararmos a progressão do número de astrócitos com a diminuição correspondente do número de redes perineuronais nas janelas temporais investigadas (Figura 20). Notar que a redução do número de redes perineuronais entre a 15^a e a 18^a semanas é ainda muito expressiva considerando que ela ocorre em intervalo de tempo que representa apenas 3 semanas num total de 18 desde a inoculação. Isso corresponde a 1/6 do total decorrido entre a inoculação e a janela de 18 semanas.

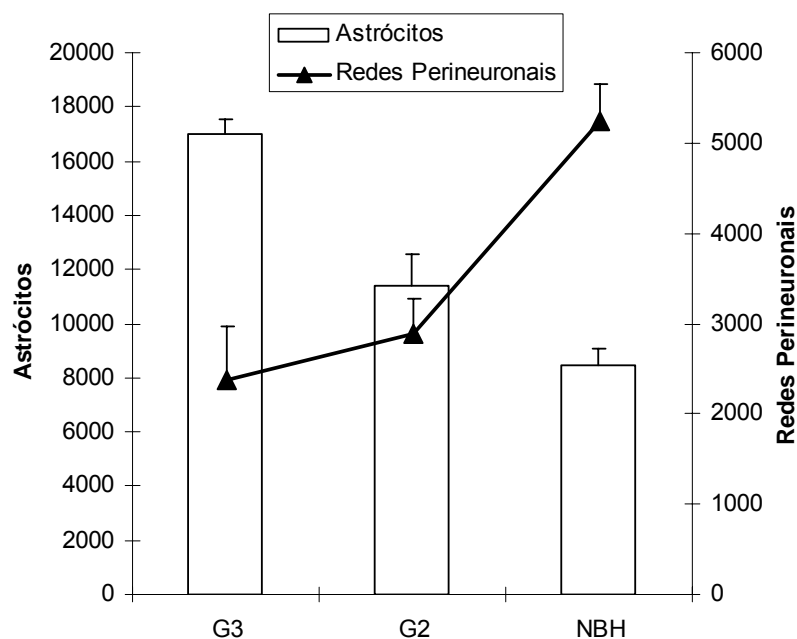


Figura.20. Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de astrócitos reativos (à esquerda) na região septal dos animais inoculados com o agente ME7 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação aos animais inoculados com homogenado cerebral normal (NBH).

A análise de regressão linear simples entre os números estimados de astrócitos e de redes perineuronais para os animais controle e infectados (Fig 21) revelou alto índice de correlação inversa (coeficiente de correlação = 0.95; $R^2 = 0.95$, $p=0.0002$) sugerindo que a matriz extracelular da região septal, que é destruída à medida que a astrocitose progride, guarda com a astrocitose relação inversamente proporcional linear.

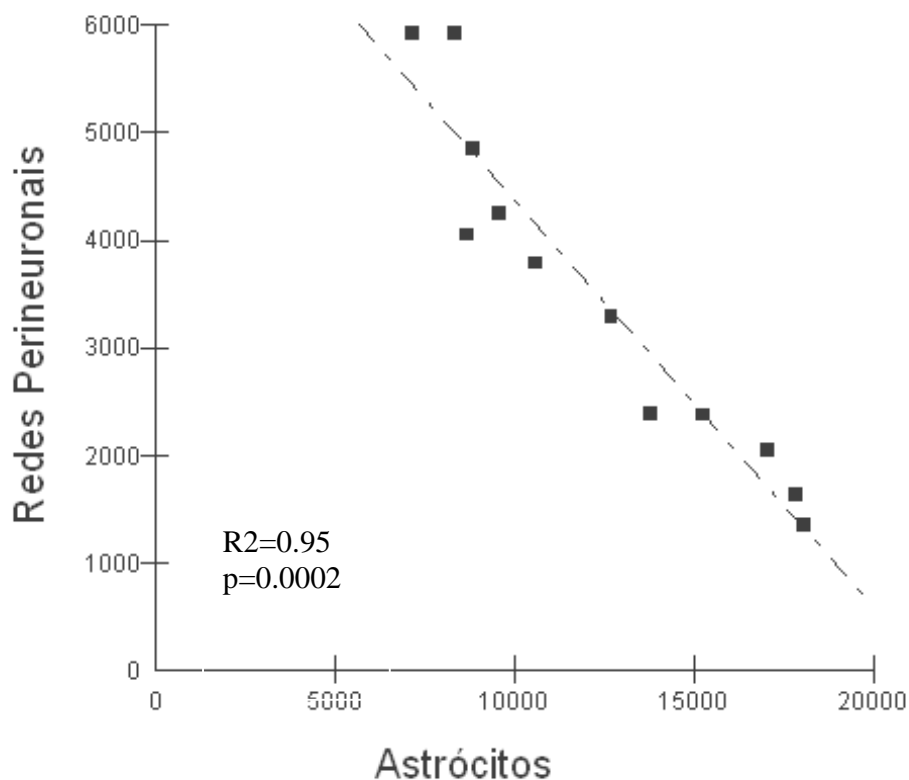


Figura. 21 Representação gráfica da curva de regressão linear simples aplicada às estimativas numéricas obtidas pelo fracionador óptico a partir de secções dos animais controle (NBH) e infectados, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1.

Para a visualização do conjunto de dados correspondentes as estimativas da região septal incluindo os três grupos experimentais (NBH, G2 e G3) a figura 22 ilustra simultaneamente os resultados.

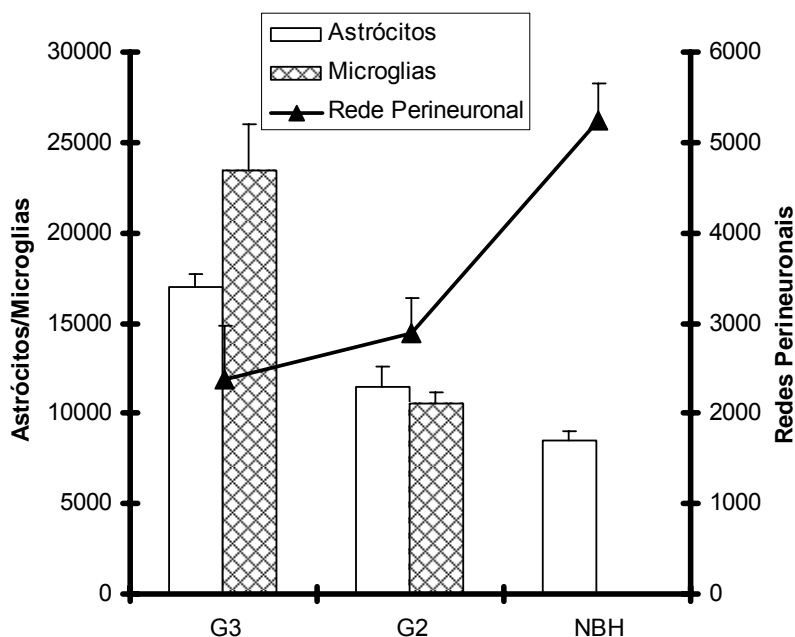


Figura.22. Representação gráfica das estimativas do número médio de astrócitos, microglias e redes perineuronais na região septal medial e lateral dos animais controle (NBH) e ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação dos homogenados cerebrais normal e infectado.

Enquanto a região septal revelou aumento de 123% no número de microglias ativadas entre a 15ª e 18ª semanas, encontrou-se no mesmo período redução de 22% no número de redes. A comparação do número estimado de redes perineuronais dos animais sacrificados 18 semanas após a inoculação do agente ME7 com o estimado para os animais NBH revelou redução de 45%. O número estimado de astrócitos reativos por sua vez revelou acréscimo de cerca de 49% entre a 15ª e a 18ª

semanas e de cerca de 101% quando se comparam as estimativas da 18ª semana com aquela do grupo NBH. Entretanto já se detecta aumento médio de 35% no número de astrócitos em relação ao grupo NBH, 15 semanas após a inoculação do agente ME7. Todas essas diferenças percentuais entre as médias dos números estimados para os grupos NBH, ME7(G2) e ME7(G3) foram estatisticamente significativas (ANOVA, um critério, teste de Bonferroni *a priori* $p < 0.025$).

Camada Polimórfica do Giro Denteado

Os ensaios estereológicos para a camada polimórfica se restringem a microglia ativada e astrócitos reativos, uma vez que não se encontram redes perineuronais marcadas pela histoquímica com *Wisteria Floribunda* nessa camada. As tabelas 11 e 12 contêm respectivamente os parâmetros estereológicos adotados e os resultados das estimativas do número dessas células nos animais controle (NBH) e infectados (ME7) 15 e 18 semanas após a inoculação dos homogenados cerebrais. A comparação com o grupo controle só foi possível para os astrócitos reativos dado que a histoquímica para marcação da microglia ativada não revela de forma adequada a microglia residente.

Tabela 11. Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Astrócitos Reativos ($\Sigma Q'$) na Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) Semanas após a Inoculação do agente ME7⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	$\Sigma Q'$
NBH-4	30 x 30	60 x 60	0.25	0.38 ± 0.03	1/5	188	6	232
NBH-5	30 x 30	60 x 60	0.25	0.36 ± 0.02	1/5	184	6	143
NBH-6	30 x 30	60 x 60	0.25	0.32 ± 0.03	1/5	184	6	188
NBH-9	30 x 30	60 x 60	0.25	0.30 ± 0.004	1/5	185	6	151
ME7-4G2 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0.25	0.32 ± 0.02	1/5	168	6	232
ME7-2G2 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0.25	0.34 ± 0.01	1/5	212	6	252
ME7-8G2 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0.25	0.32 ± 0.02	1/5	219	6	230
ME7-9G2 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0.25	0.66 ± 0.03	1/5	201	6	326
ME7-1G3 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0,25	0.40 ± 0.07	1/5	250	6	262
ME7-5G3 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0,25	0.32 ± 0.03	1/5	242	6	307
ME7-6G3 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0,25	0.27 ± 0.02	1/5	209	6	213
ME7-7G3 ⁽²⁾	30 x 30	60 x 60	0,25	0.31 ± 0.004	1/5	224	6	233

⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Tabela 12. Estimativa Individual Unilateral do Número de Astrócitos Reativos (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos controle (NBH), 15^a(G2) e 18^a(G3) semanas Sacrificados após a Inoculação do Agente ME7 ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
NBH4	22.05 ± 0.38	12672	0.06
NBH5	22.44 ± 1.32	8147	0.06
NBH-6	27.2 ± 4.10	9946	0.06
NBH-9	23.8 ± 0.30	9041	0.06
Média		9951	0.06
D.P.		1956	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.038	
CE^2		0.0036	
CE^2/CV^2		0.095	
CVB^2		0.0344	
CVB^2 (% of CV^2)		90.5%	
ME7-4G2 ⁽²⁾	25.9 ± 1.81	15778	0.07
ME7-2G2 ⁽²⁾	23.95 ± 1.04	15345	0.05
ME7-8G2 ⁽²⁾	25.40 ± 1.41	14936	0.05
ME7-9G2 ⁽²⁾	12.54 ± 0.55	10260	0.06
Média	21.95 ± 3.16	14080	0.057
D.P.		± 2570	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0324	
CE^2		0.0032	
CE^2/CV^2		0.099	
CVB^2		0.0292	
CVB^2 (% of CV^2)		90.12%	
ME7-1G3 ⁽²⁾	20.0 ± 0.35	13046	0.05
ME7-5G3 ⁽²⁾	24.73 ± 0.22	19046	0.05
ME7-6G3 ⁽²⁾	29.7 ± 2.31	15470	0.05
ME7-7G3 ⁽²⁾	25.8 ± 0.33	14975	0.05
Média	14.64 ± 0.29	15634	0.05
D.P.		± 2503	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.026	
CE^2		0.0025	
CE^2/CV^2		0.096	
CVB^2		0.0235	
CVB^2 (% of CV^2)		90.38%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

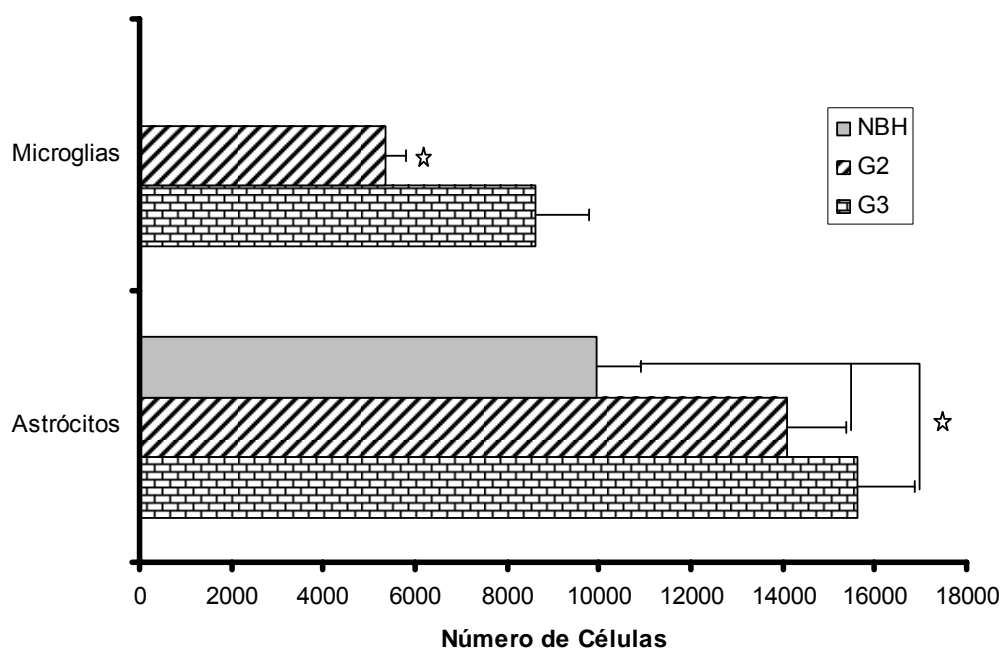


Figura.23. Representação gráfica do número estimado de astrócitos e microglias para a camada polimórfica do giro denteado para os animais controle (NBH) e infectados (ME7), 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação. (*) indica diferença estatística significativa (ANOVA, um critério, $p < 0.025$, para astrócitos ou teste bi-caudal $p < 0.05$, para microglias).

A Figura 23 é uma representação gráfica do número estimado de microglias, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 e do número estimado de astrócitos da camada polimórfica do giro denteado para os grupos NBH e ME7 (G2 e G3). Notar que enquanto se detectou diferença estatística significativa entre as estimativas do número de microglias entre a 15ª e a 18ª semanas, a contagem de astrócitos para essa camada só revelou diferença estatística significativa quando se comparam os animais infectados com o grupo NBH.

Para realizar a comparação dos achados quantitativos da camada polimórfica com aqueles da região septal adotamos índice relativo para medida proporcional da astrocitose reativa e da ativação microglial. Para isso calculamos o contraste entre as estimativas para as janelas G2 e G3 definido previamente como a relação:

$C = (E18 - E15)/(E18 + E15)$, onde

C= Contraste; E18 = Estimativa na 18ª semana; E15 = Estimativa na 15ª semana; As estimativas E18 e E15 que correspondem às janelas temporais se aplicam a qualquer marcador. Para as redes perineuronais que evoluem na doença com redução do número, o valor do contraste é precedido do sinal menos. Os resultados do cálculo desse índice revelaram proporções diferentes na taxa de ativação microglial e astrocítica (Figura 24) e de redução das redes perineuronais. Enquanto a astrocitose na região septal evoluiu rapidamente, na camada polimórfica a taxa de crescimento nas mesmas janelas, não gera diferenças significantes no número estimado de astrócitos. Por outro lado, a aplicação do mesmo índice às estimativas para microglia ativada comparando as mesmas janelas (15ª e 18ª semanas) revelou diferenças significativas, sugerindo que a taxa de ativação microglial é mais alta do que a dos astrócitos para o mesmo período.

Tomados em conjunto os dados sugerem a ocorrência de diferenças regionais importantes na intensidade da astrocitose reativa e da ativação microglial na doença prion induzida em fêmeas adultas do camundongo da variedade Suíça albina a partir da inoculação intrahipocampal do agente ME7. As razões para essas diferenças permanecem obscuras, mas investiga-se presentemente no laboratório a concentração de placas contendo a proteína PrP^{SC} em cada uma das regiões estudadas dado que parece existir correlação estreita entre a presença das placas no parênquima e a ativação microglial (Franklin et al., 2008).

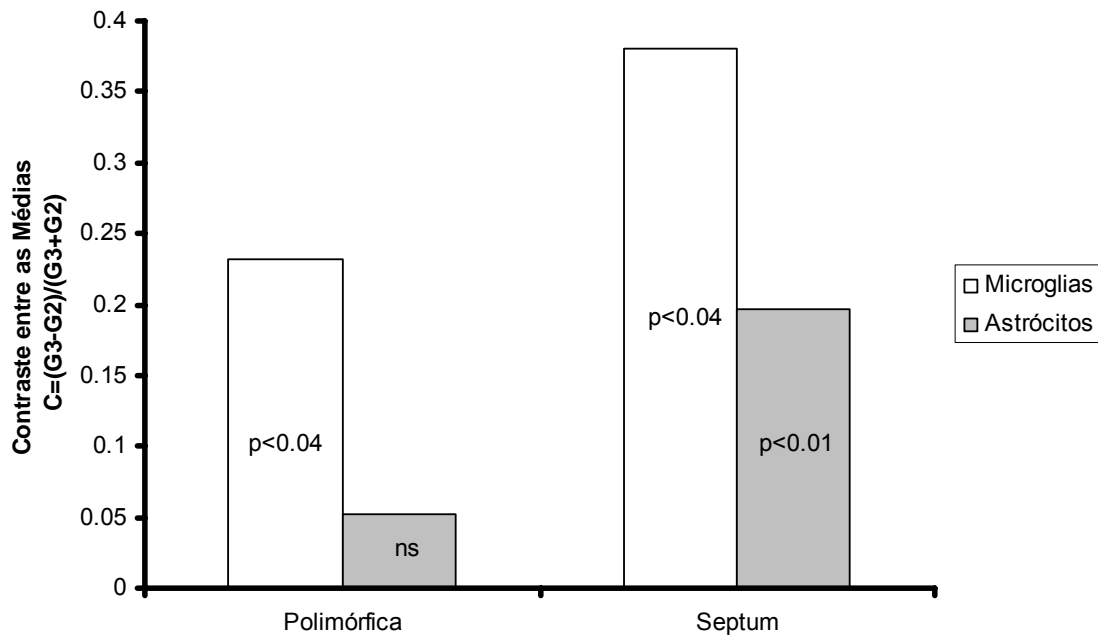


Fig.24. Representação gráfica do contraste entre as médias das estimativas do número de astrócitos e microglias 15 e 18 semanas após inoculação do agente ME7 na camada polimórfica e na região septal em fêmeas adultas do camundongo Suíço albino.

Finalmente é útil comparar a resposta astrocítica isolada na área septal e na camada polimórfica utilizando o índice relativo de astrocitose reativa obtido pelo cálculo do contraste entre as estimativas obtidas para os grupos NBH e ME7 (Figura 25). Notar que em relação ao grupo controle o septum parece ser novamente mais reativo do que a camada polimórfica com resultados significativos para todas as associações possíveis entre os grupos experimentais (ANOVA, um critério, teste de Bonferroni, apriori, $p<0.025$) enquanto que a camada polimórfica não apresenta diferença significativa quando se calcula o contraste entre as estimativas obtidas para os grupos G2 e G3.

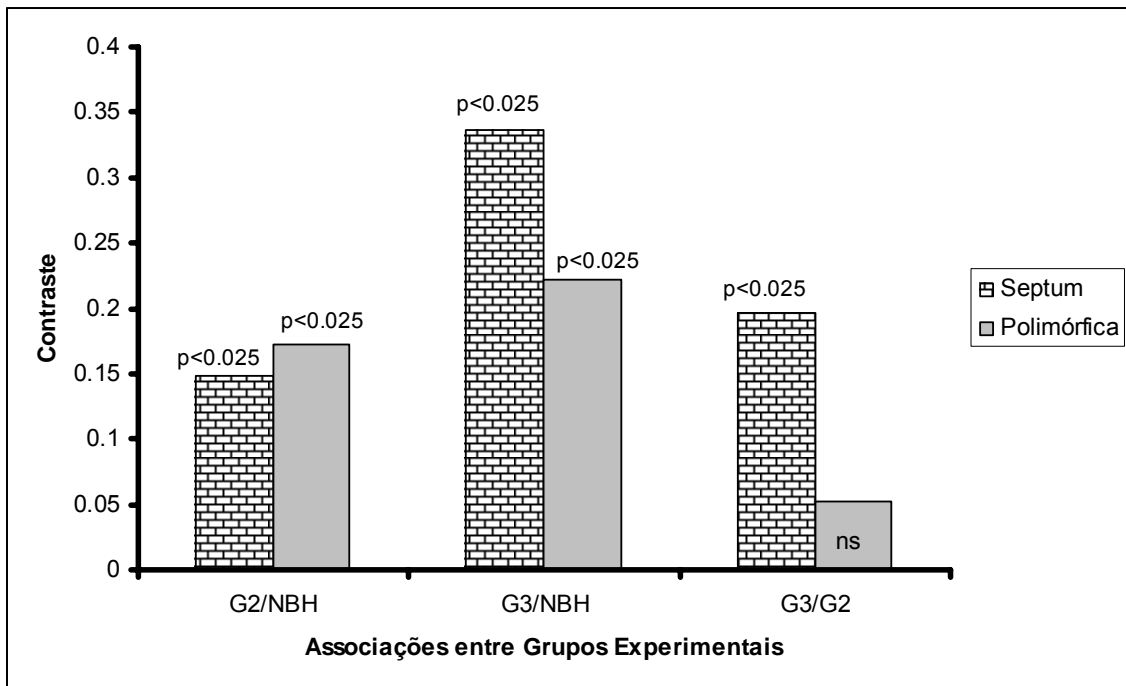


Fig.25. Representação gráfica da taxa de ativação astrogliar relativa na região septal e polimórfica utilizando o cálculo do contraste entre as estimativas do número total de astrócitos obtidos para os grupos NBH e ME7 (G2 e G3).

4.2.2.4 Neurônios

Região Septal

As tabelas 13 e 14 correspondem respectivamente aos parâmetros de contagem e estimativas do número total de neurônios imunomarcados para Neu-N, a espessura média das secções, aos coeficientes de erro, a relação entre este último e o coeficiente de variação assim como a variação biológica das estimativas feitas para a região septal medial e lateral de animais controle (NBH) e infectados pelo agente ME7.

Tabela 13 Parâmetros Experimentais e Número de Neurônios Contados (ΣQ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, dos grupos controle (NBH) e 18ª (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de Caixas</i>	<i>No de Secções</i>	ΣQ
NBH-4	30 x 30	100 x 100	0,09	0.39 ± 0.004	1/5	192	3	583
NBH-3	30 x 30	100 x 100	0,09	0.41 ± 0.003	1/5	257	3	601
NBH-10	30 x 30	100 x 100	0,09	0.29 ± 0.01	1/5	172	3	609
NBH-5	30 x 30	100 x 100	0,09	0,49 ± 0.008	1/5	204	3	645
ME7-4G3 ⁽²⁾	30 x 30	100 x 100	0,09	0.42 ± 0.01	1/5	200	3	515
ME7-8G3	30 x 30	100 x 100	0,09	0.43 ± 0.002	1/5	190	3	678
ME7-6G3	30 x 30	100 x 100	0,09	0.41 ± 0.003	1/5	239	3	757
ME7-10 G3	30 x 30	100 x 100	0,09	0.41 ± 0.02	1/5	184	3	744

⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Tabela 14 Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos controle (NBH) e 18ª(G3) semanas Sacrificados após a Inoculação do Agente ME7⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
NBH-4	20.88± 0.22	84890	0.044
NBH-3	19.64 ± 0.12	82795	0.05
NBH-10	28.37 ± 1.33	120001	0.046
NBH-5	16.37 ± 0.28	72891	0.045
Média		90144	0.046
D.P.		20581	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0529	
CE^2		0.0021	
CE^2/CV^2		0.04	
CVB^2		0.0021	
CVB^2 (% of CV^2)		96.03%	
ME7-4G3	19.27 ± 0.4	68217	0.049
ME7-8G3	18.7 ± 0.1	88214	0.049
ME7-6G3	19.57 ± 0.14	103285	0.041
ME7-10G3	19.5 ± 0.79	98418	0.043
Média	19.26 ± 0.20	89533	0.0455
D.P.		± 15337	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0289	
CE^2		0.0020	
CE^2/CV^2		0.0716	
CVB^2		0.0269	
CVB^2 (% of CV^2)		93.1%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Área da caixa de contagem, $a(\text{caixa})$; dimensões de X, Y, $A(X, Y)$; asf , fração amostral da área da grade [$a(\text{caixa})/A(X, Y)$]; tsf , fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: $h/\text{espessura da secção}$; ssf , fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

A aplicação do teste t bicaudal para amostras independentes não revelou diferenças significativas entre os grupos NBH e G3 na região septal, pelo menos para a janela temporal testada, a despeito da intensa ativação microglial e astrocitose reativa detectada nesse momento nos animais infectados pelo agente ME7.

Giro Denteado

As tabelas 15, 17 e 19 referem-se aos parâmetros de contagem e as tabelas 16, 18 e 20 aos números médios das estimativas do número total de neurônios, da espessura média das secções, dos coeficientes de erro de Scheaffer, à relação entre este último e o coeficiente de variação assim como a variação biológica para as camadas granular, polimórfica e molecular do giro denteado respectivamente. De um modo geral as estimativas do número de neurônios nos animais controle são menores do que aqueles descritos para o camundongo C57Bl6J nas regiões equivalentes.

Tabela 15. Parâmetros experimentais e total de neurônios (ΣQ), para a Camada Granular do Giro Denteado de fêmeas adultas do camundongo albino Suiço do grupo controle (NBH) e do grupo sacrificado 18 semanas após a inoculação do agente ME7 (G3) ⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X, Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No. de Caixas</i>	<i>No. de Secções</i>	ΣQ
NBH3-G2 ⁽²⁾	30 x 30	75 x 75	0.16	0.32 ± 0.01	1/5	164	6	1904
NBH8-G3 ⁽²⁾	30 x 30	75 x 75	0.16	0.32 ± 0.01	1/5	170	6	1538
NBH3-G3 ⁽²⁾	30 x 30	75 x 75	0.16	0.45 ± 0.009	1/5	134	6	1441
NBH5-G3 ⁽²⁾	30 x 30	75 x 75	0.16	0.37 ± 0.008	1/5	225	6	2045
ME78-G3	30 x 30	75 x 75	0.16	0.32 ± 0.01	1/5	180	6	1910
ME710-G3	30 x 30	75 x 75	0.16	0.30 ± 0.02	1/5	166	6	1676
ME74-G3	30 x 30	75 x 75	0.16	0.30 ± 0.02	1/5	197	6	1246
ME76-G3	30 x 30	75 x 75	0.16	0.62 ± 0.007	1/5	219	6	2679

⁽¹⁾Área da caixa de contagem, *a(caixa)*; dimensões de X, Y, *A(X, Y)* ; *asf*, fração amostral da área da grade [*a(caixa)*/*A(X, Y)*]; *tsf*, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: *h/espessura da secção*; *ssf*, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Os animais doentes, não apresentaram perdas neuronais detectáveis na região septal e no giro denteado a despeito da astrocitose e microgliose claramente identificadas nas mesmas regiões. Esses resultados relativos a ausência de morte neuronal nas fases iniciais da doença são semelhantes aos obtidos na variedade C57Bl6J onde a redução do número de neurônios em CA1 só ocorre em estágios mais tardios (Cunningham et al., 2003).

Tabela 16. Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Granular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suiço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE)..

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
NBH-3G2	25.76 ± 1.05	189962	0.057
NBH8-G3	25.29 ± 0.32	150236	0.049
NBH3-G3	17.88 ± 0.35	103279	0.057
NBH5-G3	22.12 ± 0.43	169609	0.038
Média		153271	0.050
D.P.		± 37066	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.0576	
CE^2		0.0020	
CE^2/CV^2		0.035	
CVB^2		0.0556	
CVB^2 (% of CV^2)		96,53%	
ME7-8G3	25.46 ± 0.85	153435	0.051
ME7-10G3	28.00 ± 1.90	180916	0.046
ME7-4G3	27.8 ± 2.10	135575	0.050
ME7-G3	20.65 ± 0.24	143488	0.030
Média		153353	0.044
D.P.		19776	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.017	
CE^2		0.002	
CE^2/CV^2		0.12	
CVB^2		0.015	
CVB^2 (% of CV^2)		88,23%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Área da caixa de contagem, $a(\text{caixa})$; dimensões de X, Y, $A(X, Y)$; asf , fração amostral da área da grade [$a(\text{caixa})/A(X, Y)$]; tsf , fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: $h/\text{espessura da secção}$; ssf , fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Tabela 17. Parâmetros Experimentais e Total de Neurônios Contados ($\Sigma Q'$), para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suiço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 Semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X, Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	$\Sigma Q'$
NBH-3G2 ⁽²⁾	40 x 40	50 x 50	0,64	0,28 ± 0.003	1/5	299	6	803
NBH-8G3 ⁽²⁾	40 x 40	50 x 50	0,64	0.37 ± 0.006	1/5	275	6	967
NBH-3G3 ⁽²⁾	40 x 40	50 x 50	0,64	0.42 ± 0.020	1/5	328	6	974
NBH-5G3 ⁽²⁾	40 x 40	50 x 50	0,64	0.36 ± 0.003	1/5	243	6	1155
ME-78G3	40 x 40	50 x 50	0,64	0.34 ± 0.007	1/5	329	6	1009
ME7-10G3	40 x 40	50 x 50	0,64	0.31 ± 0.010	1/5	318	6	1411
ME7-4G3	40 x 40	50 x 50	0,64	0.38 ± 0.020	1/5	369	6	851
ME7-6G3	40 x 40	50 x 50	0,64	0.37 ± 0.020	1/5	292	5	1113

⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

Tabela 18. Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
ME7-8G3	23.71 ± 0.39	23101	0.042
ME7-10G3	26.51 ± 1.38	35977	0.047
ME7-4G3	21.43 ± 0.39	17493	0.043
ME7-6G3	22.24 ± 1.32	22911	0.044
Média	23.47 ± 1.12	24870	0.044
D.P.		± 7848	
CV ² =(D.P./Média) ²		0.0961	
CE ²		0.002	
CE ² /CV ²		0.021	
CVB ²		0.0941	
CVB ² (% of CV ²)		98.0%	
NBH-3G2	28.29 ± 0.29	24469	0.052
NBH-8G3	22.00 ± 0.31	20700	0.040
NBH-3G3	19.67 ± 0.73	18580	0.044
NBH-5G3	22.43 ± 0.48	25432	0.040
Média		22295	0.044
D.P.		± 3210	
CV ² =(D.P./Média) ²		0.021	
CE ²		0.0020	
CE ² /CV ²		0.09	
CVB ²		0.02	
CVB ² (% of CV ²)		90.48%	

CVB² = CV² - CE² (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75µm).

Tabela 19. Parâmetros Experimentais e Total de Neurônios Contados (ΣQ^+), para a Camada Molecular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suiço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 Semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X, Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>No de</i> <i>Caixas</i>	<i>No de</i> <i>Secções</i>	ΣQ^+
NBH-3G2 ⁽²⁾	60 x 60	100 x 100	0,36	0.31 ± 0.01	1/5	197	6	432
NBH-8G3 ⁽²⁾	60 x 60	100 x 100	0,36	0.50 ± 0.005	1/5	211	6	254
NBH-3G3 ⁽²⁾	60 x 60	100 x 100	0,36	0.44 ± 0.01	1/5	188	6	427
NBH-5G3 ⁽²⁾	60 x 60	100 x 100	0,36	0.45 ± 0.008	1/5	223	6	408
ME7-8G3	60 x 60	100 x 100	0,36	0.39 ± 0.01	1/5	204	6	356
ME7-10G3	60 x 60	100 x 100	0,36	0.39 ± 0.006	1/5	198	6	245
ME7-4G3	60 x 60	100 x 100	0,36	0.36 ± 0.013	1/5	248	6	317
ME7-6G3	60 x 60	100 x 100	0,36	0.37 ± 0.01	1/5	224	6	345

⁽¹⁾Area da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Tabela 20. Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Molecular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suiço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) ⁽¹⁾. Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).

<i>Animais</i>	<i>Espessura</i> <i>da Secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
ME7-8G3	21.26 ± 0.85	13006	0.11
ME7-10G3	20.85 ± 0.27	9002	0.11
ME7-4G3	23.03 ± 0.79	12623	0.11
ME7-6G3	21.89 ± 0.71	12967	0.11
Média	21.76 ± 0.47	11899	0.11
D.P.		± 970	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.66	
CE^2		0.0121	
CE^2/CV^2		0.018	
CVB^2		0.6479	
CVB^2 (% of CV^2)		98.2%	
NBH-3G2	26.58 ± 0.92	19902	0.10
NBH-8G3	16.09 ± 0.14	7051	0.11
NBH-3G3	18.38 ± 0.37	13101	0.11
NBH-5G3	18.26 ± 0.37	13031	0.10
Média	19.83 ± 2.31	13271	0.10
D.P.		± 5252	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0.1521	
CE^2		0.0100	
CE^2/CV^2		0.065	
CVB^2		0.1421	
CVB^2 (% of CV^2)		93.4%	

$CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). ⁽¹⁾Área da caixa de contagem, $a(\text{caixa})$; dimensões de X, Y, $A(X, Y)$; asf , fração amostral da área da grade $[a(\text{caixa})/A(X, Y)]$; tsf , fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: $h/\text{espessura da secção}$; ssf , fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μ m).

Tabela 21. Números Estimados para as Camadas Granular, Polimórfica, Molecular e total do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais NBH e ME7, 18(G3) Semanas após as Inoculações.

	<i>Granular</i>	<i>Polimórfica</i>	<i>Molecular</i>	<i>Total</i>
NBH(*)	153271 \pm 37066	22295 \pm 3210	13271 \pm 5251	188838 \pm 42663
ME7(*)	153353 \pm 19776	24870 \pm 7847	11899 \pm 970	190123 \pm 25772

(*) Os números indicam valores médios e respectivos desvios padrão.

A comparação das estimativas do número de neurônios das camadas granular, polimórfica e molecular do giro denteado dos animais inoculados com NBH ou com ME7 e sacrificados 18 semanas após a inoculação (tabelas 16, 18 e 20) não revelou diferenças estatísticas significativas (Teste T, bi-caudal $p > 0.05$). A Tabela 21 compila os dados comparativos.

4.3. ACHADOS COMPORTAMENTAIS NOS CAMUNDONGOS C57BL6J E ALBINO SUIÇO: REMOÇÃO E ESTOCAGEM DE COMIDA, ARENA ABERTA (OPEN FIELD) E PONTE DE BASTÕES.

No teste de remoção de ração (burrowing) os camundongos C57BL6J doentes diminuíram a atividade de remoção e estocagem em relação aos respectivos controles na 12^a semana, enquanto que nos Suíços doentes essa atividade foi reduzida somente na 16^a semana ($p < 0.05$ ANOVA um critério). A

redução na atividade exploratória no campo aberto dos Suíços doentes foi observada na 20ª semana enquanto que os C57BL6J doentes já a apresentavam desde a 16ª semana (ver Figura 26). Na ponte de bastões tanto os camundongos C57BL6J quanto os albinos aumentaram significativamente o tempo para percorrê-la apenas na fase clínica da doença.

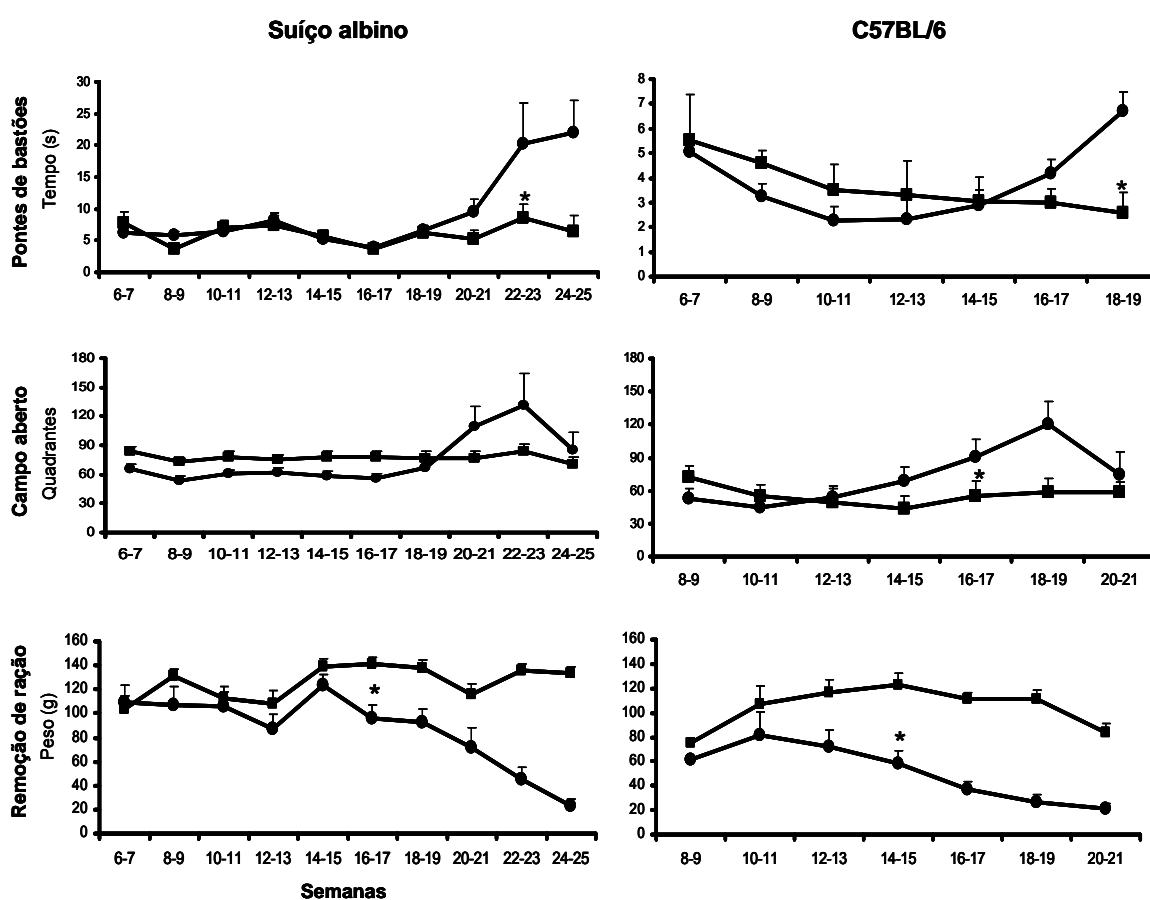


Fig.26. Ensaios comportamentais comparados para os testes: ponte de bastões, (acima), campo aberto (meio) remoção de ração (abaixo). À esquerda o desempenho dos camundongos Suíços albinos e à direita o da variedade C57BL6, medidos em tempo (s), número de quadrados atravessados e gramas de ração. ■(NBH); (ME7). (*) indica diferença estatística significativa

Comparando-se esses achados aos da neuropatologia depreende-se que as alterações neuropatológicas detectadas parecem se antecipar às alterações comportamentais pelo menos em uma semana. Da análise de cada animal e do grupo como um todo se constatou, a existência de pelo menos dois subgrupos distintos que progredem na doença com velocidades diferentes (Figura 27).

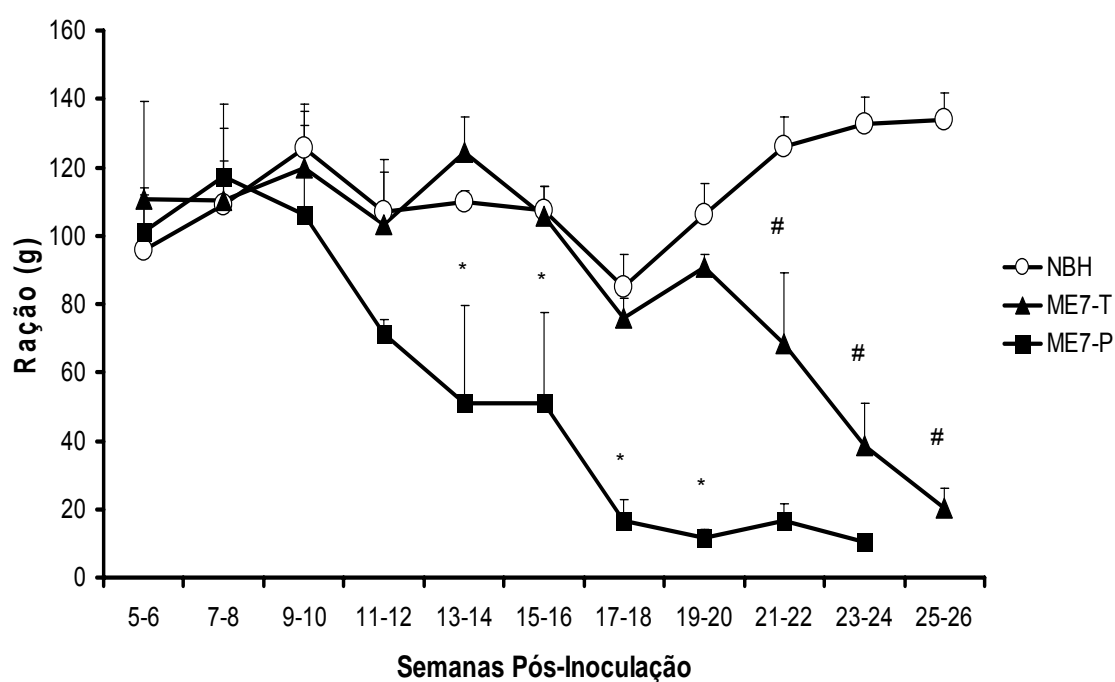


Fig.27. Representação gráfica demonstrando a existência de formação de grupos distintos. O grupo ME7-P mostrou-se mais sensível em relação ao grupo controle e ME7-T ($p < 0.05$) com quadro clínico precoce (13ª e 14ª semanas PI). O grupo ME7-T mostrou-se mais resistente em relação ao grupo ME7-P ($p < 0.05$) com quadro clínico tardio (21ª e 22ª semanas PI).

A aplicação da análise de cluster seguida da análise discriminante aos resultados dos três testes comportamentais a cada quinzena, revelou na variedade Suíça albina, que o “burrowing” é a única variável que distingue a sensibilidade dos animais ao agente ME7. Assim, tendo como base os resultados

do burrowing distinguiu-se a presença de dois subgrupos de animais: um grupo menor (em torno de 40%, n=4), mais sensível, onde a doença cursa mais rápida e os animais atingem a fase terminal em 22 semanas, e outro maior (em torno de 60%, n=6), menos sensível, onde os animais atingem a fase terminal em 26 semanas. Infelizmente não se dispõe da análise neuropatológica quantitativa desses animais, razão pela qual é difícil antecipar possíveis correlações sem viés. De qualquer modo, da análise dos grupos onde essa correlação foi possível, as alterações neuropatológicas foram sempre detectadas antes das alterações comportamentais. Por conta disso é razoável supor que a ativação microglial e a astrocitose reativa devem ter estado presentes de forma mais precoce nos animais do subgrupo onde a doença evoluiu de forma mais rápida.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho implantou-se como modelo experimental para estudos de neurodegeneração crônica a doença prion induzida pelo agente ME7 no camundongo da variedade Suíça albina demonstrando que as alterações comportamentais e neuropatológicas seguem de perto as previamente descritas para o camundongo C57Bl6J com duas exceções: 1) o septum ao invés do hipocampo é a região onde se detectou mais precocemente o maior número proporcional de microglias ativadas e astrócitos reativos e onde houve correspondentemente a maior redução de redes perineuronais nos estágios iniciais da doença; 2) o curso temporal da doença é em média 4 semanas mais longo na variedade Suíça albina. Semelhante ao encontrado no C57Bl6J não se encontrou diferença nas estimativas do número de neurônios nos animais inoculados com o agente ME7 em relação aos inoculados com homogenado cerebral normal em estágios iniciais da doença, pelo menos até 18 semanas após a inoculação.

5.1. ANÁLISE COMPARATIVA DA EVOLUÇÃO DA DOENÇA PRION NOS MODELOS MURINOS C57Bl6J E ALBINO SUÍÇO.

5.1.1 Ensaios Comportamentais

Um dos objetivos do presente trabalho foi investigar as mudanças comportamentais e neuropatológicas em duas das numerosas variedades da espécie

Mus musculus: o camundongo Suíço albino e o C57Bl6J. Essas modificações foram estudadas após injeções bilaterais intra-hipocâmpais do agente ME7 ou de homogenado cerebral normal em CA1. Para isso empregou-se testes comportamentais que utilizam comportamentos típicos da espécie tais como os testes de remoção de comida e exploração em campo aberto empregados no presente trabalho. Camundongos naturalmente removem péletes de ração colocados em um tubo em sua gaiola e a quantidade removida é um indicador útil da intensidade da atividade, assim como, exploram naturalmente o lugar onde são colocados, sendo fácil medir a intensidade dessa atividade pela contagem do número de quadrados pintados no chão onde se dá a exploração. Dos três testes aplicados no presente trabalho a atividade de remoção de comida foi o mais afetado pela doença em sua fase inicial corroborando achados anteriores descritos para a variedade C57Bl6J (Deacon et al., 2001). Nesse teste os animais hígidos removem do tubo quantidade de comida várias vezes maior do que seu próprio peso em 2h, repetindo esse procedimento todos os dias com igual intensidade enquanto que os animais doentes declinam essa atividade rapidamente.

Os ensaios comportamentais avaliados ao longo do curso da doença revelaram diferenças significativas para os três testes entre os sujeitos das variedades C57 e Suíça albina : nos primeiros as alterações se instalaram respectivamente para cada teste, na 12^a, 16^a e 18^a semanas, enquanto que para os últimos as mudanças se deram na 16^a, 20^a e 22^a semanas ($p < 0.05$, ANOVA um critério teste *a priori* de Bonferroni). Os ensaios comportamentais com a variedade C57Bl6J do presente trabalho confirmam portanto achados anteriores para essa variedade (Betmouni et al.,

1999; Cunningham et al., 2003; Cunningham et al., 2005b; Deacon et al., 2001; Guenther et al., 2001).

Da análise de cada animal e do grupo como um todo constatou-se entretanto na variedade Suíça albina a existência de pelo menos dois subgrupos distintos que progredem na doença com velocidades diferentes. Esses resultados parecem ser altamente reprodutíveis e os resultados dos testes podem ser usados para avaliar de forma não invasiva o estágio da progressão da doença. Os animais doentes por outro lado, após um período de incubação variável têm a atividade de “burrowing” diminuída e essa diminuição parece estar associada à alterações neuropatológicas de circuitos que envolvem o hipocampo (Deacon et al., 2002). Os circuitos hipocampais, suas aferências e eferências parecem desempenhar papel importante no processamento de estímulos externos ligados à motivação inata, à programas motores associados à comportamentos naturais de cada espécie assim como às relações espaciais do ambiente durante o comportamento exploratório (Deacon et al., 2005).

É interessante registrar que na nova variante da doença de Creutzfeldt-Jacob a apatia e a perda de interesse são também observações freqüentes nos estágios iniciais da doença (Spencer et al., 2002) assim como a incapacidade para lidar com as coisas do dia-a-dia também é observação freqüente na doença de Alzheimer (Reisberg et al., 2001). Importante realçar que embora existam alterações hipocampais evidentes na doença de Alzheimer, na doença de Creutzfeldt o hipocampo não é a região mais afetada pela doença (Masullo and Machi, 1997).

A segunda modificação importante no camundongo infectado pelo agente ME7 é o aumento da atividade locomotora no campo aberto em torno da 20ª semana após a inoculação do agente ME7 e que se superpõe à redução da remoção de comida já

instalada. Durante um período curto (4 semanas) tanto os camundongos da variedade C57Bl6 (entre a 16^a a 20^a) quanto os da Suíça albina (entre a 20^a a 24^a), infectados pelo agente ME7, apresentam marcada hiperatividade em relação aos camundongos do grupo controle, com maior número de quadrados cruzados por unidade de tempo. Num caso e noutro, parece que a inserção dos animais doentes em um novo ambiente dispara ciclos mais longos de atividade exploratória quando comparados aos controles respectivos que normalmente a diminuem com a habituação ao ambiente.

Uma possível interpretação para esses resultados seria a presença de ansiedade aumentada em resposta à novidade, mas a ausência de documentação detalhada acerca de outros sinais compatíveis com o comportamento ansioso torna os achados insuficientes para caracterizar a resposta como tal. Uma alternativa para avaliar a presença de ansiedade seria a aplicação de outros testes comportamentais mais apropriados para medir alterações compatíveis com o estado ansioso, como o labirinto em cruz elevado, por exemplo. Realmente, em nosso laboratório (Trevia, 2008) a aplicação desse teste à variedade C57Bl6J revelou aumento do tempo de exploração do braço aberto por animais doentes, um resultado oposto ao que seria esperado se houvesse aumento da ansiedade. Permanece, portanto em aberto qual a origem fisiopatológica desse aumento da atividade locomotora que se restringe ao período intermediário da doença, desaparecendo em seguida.

O terceiro evento comportamental e mais tardio dentre os três escolhidos para avaliar foi a presença de alterações motoras identificadas através do tempo médio para cruzar a ponte de bastões. Durante a maior parte da progressão da doença o tempo para cruzar a ponte é reduzido por conta do aprendizado motor que evolui de

forma satisfatória até a 22ª semana na variedade Suíça albina e a 18ª semana na C57Bl6. A partir dessas janelas temporais o tempo para cruzar a ponte de bastões aumenta de forma significativa quando comparamos os animais doentes aos respectivos grupos controles. Esse resultado parece ser consequência da incoordenação motora medida através do número de erros cometidos ao tentar posicionar as patas nos bastões da ponte, aumentando o tempo necessário para cruzá-la. É possível que tais alterações ocorram por conta da progressão das lesões sensório-motoras talâmicas e cerebelares agravadas nesse estágio tardio (Cunningham, 2005). O comprometimento progressivo de outros núcleos talâmicos relacionados ao sistema límbico contribuem para o aparecimento subsequente de alterações autonômicas promovendo nos estágios tardios a perda do controle dos esfíncteres (Cunningham, 2005).

5.1.2 Achados Neuropatológicos

Três achados principais caracterizam o quadro neuropatológico nos modelos estudados: microgliose e astrocitose precoces e vacuolização tardia que se instalam preferencialmente no sistema límbico. Os achados neuropatológicos revelaram em ambas as variedades de camundongos, microgliose e astrocitose precoces e vacuolização tardia nas áreas do sistema límbico, mas com intensidade relativa e início do comprometimento diferente nas diferentes áreas das duas variedades. Enquanto que no C57Bl6J, a microglia ativada aparece mais cedo e em maior proporção em CA1 no hipocampo, no tálamo e no septum, no camundongo Suíço albino o septum, a camada polimórfica do giro denteado e o tálamo, são os focos

iniciais da ativação microglial. A partir de 12 semanas, quando as alterações comportamentais se iniciam na variedade C57Bl6J, o stratum radiatum de CA1 do hipocampo é a região de maior ativação microglial embora também já estejam ativados em menor proporção o septum medial e lateral e o córtex entorrinal (Cunningham, 2005; Cunningham et al., 2003). Esse cenário muda na variedade Suíça albina onde a partir da 15ª semana em diante, detectou-se aumento progressivo da microglia ativada e dos astrócitos, com mudanças fenotípicas caracterizadas por encurtamento e espessamento das ramificações, tanto mais freqüentes quanto mais tardia a fase da doença. Em sua forma final de transformação nos estágios tardios da doença a microglia aparece em sua forma amebóide típica dos fagócitos que normalmente co-existem com outros fenótipos menos alterados. Essas mudanças neuropatológicas das fases avançadas ocorrem mais precocemente na variedade C57Bl6 (19 semanas) do que na albina Suíça (22 semanas) e se instalam em um parênquima cada vez mais vacuolizado, sendo esse o sinal neuropatológico que qualifica a encefalopatia como espongiiforme.

Mais recentemente (Franklin et al., 2008) investigaram o hipocampo ventral da variedade C57Bl6J revelando o aparecimento de alterações neuropatológicas mais precoces do que as descritas para o hipocampo dorsal em estudos anteriores (Betmouni et al., 1999; Cunningham et al., 2003). Por exemplo, oito semanas após a injeção intrahipocampal já se encontra ativação da microglia, presença de astrócitos reativos, placas amilóides ocasionais, além de 10% de perda de redes perineuronais de CA1 marcadas pela *Wisteria floribunda*.

A partir de 12 semanas após a injeção do agente ME7 há redução da plasticidade sináptica (LTP) no hipocampo ventral e déficits comportamentais em

tarefas hipocampo dependentes. Presença em 50% dos animais de placas ocasionais no hipocampo ou subiculum e nos restantes 50%, a presença de placas freqüentes particularmente no giro denteado e em CA2. Além disso, há redução de redes peridendríticas e da marcação difusa da neurópila com preservação das redes perisomáticas em CA1, no subiculum e no córtex entorrinal, na maioria dos animais inoculados (em 4 de 6 animais ME7). Nessa altura já se encontra 26% de perda de redes perineuronais em CA1.

Na 16ª semana aparece gliose e vacuolização em cortes corados por hematoxilina/eosina no hipocampo, aumento do número de microglias ativadas reveladas por histoquímica para *Lycopersicum esculentum* na formação hipocampal e em menor proporção no córtex entorrinal, com evidente encurtamento dos ramos. Presença de placas amilóides em CA1, CA2, CA3, subiculum, giro denteado e córtex entorrinal além de 18% de perda de redes perineuronais de CA1 marcadas pela *Wisteria floribunda*.

Na 20ª semana após a injeção do agente ME7 em diante há aumento acentuado da vacuolização e gliose comprometendo a formação hipocampal e o córtex entorrinal. Há ainda aumento acentuado da microglia ativada revelada por histoquímica para *Lycopersicum esculentum*, com redução do número de neurônios piramidais e aparecimento de sinais clínicos evidentes como perda de peso, incoordenação motora e aumento da imobilidade. Presença de placas amilóides em CA1, CA2, CA3, subiculum, giro denteado e córtex entorrinal de distribuição similar à de 16 semanas. Redução de 43% de redes perineuronais (dendríticas e somáticas) e da marcação difusa da neuropila em CA1 ventral, mas com particular intensidade no subiculum ventral.

No presente trabalho todas as transformações ocorrem mais tarde: por exemplo a região septal revelou aumento de 123% no número de microglias ativadas entre a 15^a e 18^a semanas e redução de 22% no número de redes perineuronais no mesmo período na mesma região. A comparação do número de redes perineuronais dos animais sacrificados 18 semanas após a inoculação do agente ME7 com o dos animais NBH revelaram redução de 45% do número de redes na mesma região.

Esses achados além de definir período de incubação mais longo para a doença prion induzida pelo agente ME7 na variedade Suíça albina, confirmam resultados prévios que demonstram correlação direta entre a destruição da matriz extracelular e o aumento do número de microglias ativadas (Franklin et al., 2008). Além disso o número estimado de astrócitos reativos na mesma região e período e sua correlação com o número estimado de redes, estende as observações anteriores à relação número de astrócitos reativos / número de redes, com pequenas diferenças quantitativas que envolvem menor acréscimo proporcional no número de astrócitos (49%) em comparação aos 123% de acréscimo da microglia entre a 15^a e a 18^a semanas para uma redução (45%) do número de redes perineuronais no mesmo período.

A microglia ativada em particular tem sido usada como instrumento de medida para detectar regiões cerebrais que estão sofrendo processos degenerativos e disfunções associadas, sendo indicador sensível de alterações neuronais ou de morte celular ou ainda de modificações homeostáticas (Cunningham, 2005; Kreutzberg, 1996; Wierzba-Bobrowicz et al., 2002). Os principais fenótipos encontrados nos estágios iniciais da doença incluem microglias ramificadas e em bastão (Wierzba-

Bobrowicz et al., 2002) enquanto que o fenótipo amebóide parece ser encontrado apenas na fase terminal da doença.

No presente trabalho, encontramos entretanto outras formas microgliais que parecem não se enquadrar claramente em nenhum dos casos, coexistindo nas diferentes janelas temporais, sugerindo a ocorrência de um contínuo morfológico entre os tipos bem definidos.

A análise estereológica da microglia ativada e de astrócitos reativos da região septal e da camada polimórfica do giro denteado pelo fracionador óptico, confirmou que a detecção das alterações comportamentais sucede o aparecimento das alterações neuropatológicas e permitiu estreitas correlações entre o número estimado de astrócitos e microglias e as alterações comportamentais.

A utilização da quantificação estereológica para astrocitose, microgliose e redução da rede perineuronal, pode ser instrumento importante para definir os limites a partir dos quais tais alterações ao invés de promover neuroproteção produzem neurotoxicidade (Block et al., 2007). A doença de Alzheimer, principal causa de demência durante o envelhecimento, está entre as primeiras doenças neurodegenerativas a ser associada com os efeitos tóxicos da ativação microglial (Block et al., 2007; Xiang et al., 2006; Yankner, 1989). De fato a superativação microglial é um evento patológico que precede a destruição da neurópila em pacientes com a doença de Alzheimer (Cagnin et al., 2001). Antes mesmo do desenvolvimento de sintomas já é possível detectar agrupamentos de microglias ativadas nos locais de acúmulo das placas β -amiloide e.g.(McGeer et al., 1987).

Até o presente não há análise quantitativa sem viés empregando estereologia que permita a correlação entre ativação microglial e morte neuronal talâmica durante

a progressão da doença de modo que a análise do impacto sobre os núcleos talâmicos se restringe aos ensaios qualitativos. Entretanto é esperado que por sua diversidade funcional, o tálamo uma vez comprometido, possa gerar uma série de déficits sensoriais específicos (às custas dos núcleos ventrais posteriores), assim como comprometimento motor (núcleos ventrais anteriores e laterais), deixando margem para o aparecimento de parestesias, dor, dormência, tremor e ataxia, que em geral são relatadas na doença humana e.g. (Macleod et al., 2002). Os núcleos cerebelares profundos para os quais igualmente não se dispõe de análise quantitativa sem viés, também têm sido descritos como sede de intensa ativação microglial (Cunningham et al., 2005a), contribuindo para a disfunção cerebelar que se torna evidente na incoordenação dos movimentos detectados em estágios tardios da doença.

Na Tabela 22 são sumariados os achados encontrados em diferentes janelas temporais para as duas variedades estudadas.

	12th	15th	17th	18th	19th	20th	22nd	26th
Redução do Burrowing	C57		Albina Suíça					
Hiperatividade no Campo aberto			C57			Albina Suíça		
Erros na Ponte de Bastões				C57			Albina Suíça	
Ativação Microglial e Astrócitos Reativos	C57	Albina Suíça						
Encurtamento/ espessamento das ramificações dos astrócitos e da microglia					C57		Albina Suíça	
Vacuolização acentuada						C57		Albina Suíça

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS E DOS OBJETOS DE INTERESSE PARA ESTIMATIVAS QUANTITATIVAS SEM VIÉS.

Empregando imunomarcagem seletiva para a proteína nuclear NeuN estimamos o número total de neurônios das camadas granular, polimórfica e molecular do giro denteado assim como da região septal medial e lateral da fêmea adulta do camundongo da variedade Suíça albina que haviam sido inoculados com o homogenado cerebral normal ou com o agente infectante ME7. Com o intuito de preencher os critérios de definição inambígua da área e dos objetos de interesse, indispensáveis ao fracionador óptico, foi feita a caracterização morfológica do giro

denteado, do hipocampo e da região septal incluindo sua laminação, limites, aferências e eferências mais significativas.

As injeções de dextrana biotinilada na camada granular do GD (transporte anterógrado de ADB de alto peso molecular) e em CA3 (transporte retrógrado de ADB de baixo peso molecular) demonstraram um grupo de fibras axonais que tem origem a partir do soma das células granulares e se direcionam para CA3 tal como previamente descrito (Amaral et al., 2007). As características dessas fibras são semelhantes a da descrição das fibras musgosas descritas por outros (Lim et al., 1997) obtidas a partir de injeções de biocitina na camada de células granulares do GD do rato.

As projeções do córtex entorrinal para a formação hipocampal são organizadas topograficamente, com os neurônios localizados nas porções laterais de AEL e AEM projetando-se para o campo dorsal (septal) da formação hipocampal, com a formação hipocampal ventral (temporal) recebendo projeções dos campos mediais de AEL e AEM (van Groen et al., 2003).

A projeção do córtex entorrinal em camundongos C57Bl6 para o giro denteado tem origem predominantemente na camada II, e esta projeção é direcionada quase inteiramente ao giro denteado ipsilateral (van Groen et al., 2003). Há também projeções para camada molecular interna no rato adulto com origem nas camadas profunda da AEM (Deller et al., 1996). A área entorrinal lateral envia axônios pela porção lateral da via perfurante que terminam no terço externo da camada molecular do giro denteado, enquanto que os axônios da área entorrinal medial AEM projetam-se pela parte medial da via perfurante e chegam ao terço médio da camada molecular do giro denteado (van Groen et al., 2003).

As injeções de dextrana biotinilada do presente trabalho se restringiram às camadas superficiais (2 e 3) e reproduziram o padrão básico de projeções observado na variedade C57Bl6J (van Groen et al., 2003). Apesar de termos encontrados os mesmos resultados previamente descritos para a variedade C57Bl6J, é interessante discutir as limitações intrínsecas ao método de investigação utilizado.

5.3. CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

5.3.1 Acerca do Neurotraçador

Nossos resultados confirmaram e expandiram à variedade Suíça Albina os achados anteriores de que injeções iontoforéticas de dextrana biotinilada revelam a morfologia axonal em grande detalhe, demonstrando mais uma vez que a técnica é eficiente para análise hodológica detalhada da formação hipocampal em murinos (van Groen et al., 2003). Assim, o padrão de resolução da marcação obtida através das injeções iontoforéticas com pipetas de vidro com 10 a 20 μ m de diâmetro interno, confirma estudos prévios utilizando o mesmo traçador no hipocampo, giro denteado e córtex entorrinal, onde terminais com excelente resolução revelaram o sistema de projeção dessas áreas (Burwell and Amaral, 1998; Dolleman-Van der Weel and Witter, 2000; Dolleman-Van der Weel et al., 1994; Dolorfo and Amaral, 1998b; Kishi et al., 2006; Reiner et al., 2000; van Groen et al., 2003; van Haeften et al., 1997).

Apesar de se afirmar que o transporte de dextrana biotinilada de alto peso molecular se dá preferencialmente na direção anterógrada, ao redor do sítio de injeção do GD e CE foi encontrada marcação retrógrada. Nesse caso o transporte

retrógrado pode ter sido provocado pela lesão inevitável provocada pelo deslocamento da pipeta durante o processo de injeção com estimulação do transporte retrógrado. A marcação de fibras de passagem é outra questão difícil de ser excluída embora tenha sido descrito anteriormente que injeções iontoforéticas com características de corrente e dimensões de pontas de pipeta comparáveis as que foram empregadas no presente trabalho dificilmente capturam fibras de passagem (Chevalier et al., 1992; King et al., 1989).

5.3.2. Acerca das Distorções no Eixo Z em Secções Obtidas com Vibrátomo

É comum optar por secções obtidas com auxílio de vibrátomo para estudos imunohistoquímicos e isso parece estar relacionado ao fato de que os anticorpos parecem penetrar mais facilmente e.g. (Dorph-Petersen et al., 2001). No presente trabalho elegemos esse procedimento adotando zona de guarda para evitar o problema do dano tecidual na superfície de corte com perda provável de objetos de interesse se a contagem fosse realizada sem o estabelecimento da zona de guarda (Andersen and Gundersen, 1999). Estudos recentes, entretanto não encontram perda de objetos de interesse nas superfícies das secções sugerindo o contrário, um acréscimo do número de objetos nessas regiões possivelmente decorrentes da compressão maior nas faces expostas à navalha durante o corte (ver figura 28) (Gardella et al., 2003). Assim é possível que esse efeito se traduza em estimativas diferentes quando as caixas de contagens estão dispostas na superfície ou no centro

das secções: enquanto a primeira abordagem tenderia a superestimar, a última tenderia a subestimar os valores.

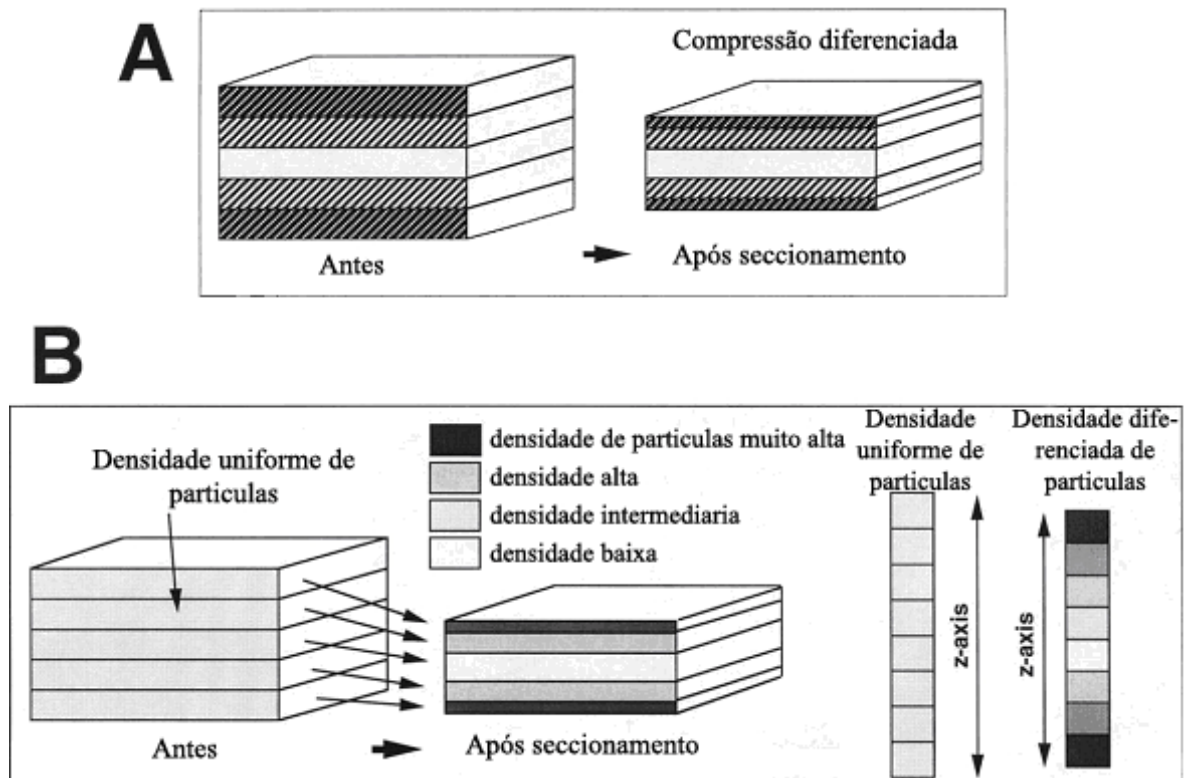


Fig.28. Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferenciada não homogênea. Fonte: (Gardella et al., 2003).

Este tipo de problema afeta todas as estimativas que empregam o dissector óptico dado que a densidade de objetos de interesse e o volume de referência são diretamente atingidos pelo efeito de compressão. No presente trabalho, entretanto empregou-se o fracionador óptico, metodologia que não utiliza nem a densidade nem o volume de referência como parâmetros para estimativa do número de neurônios o

que a torna imune aos efeitos da retração diferencial e compressão não lineares induzidas pelo processo de fixação, corte e desidratação.

5.3.3. Os Limites das Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico.

Um dos alvos do presente trabalho foi estimar o número de células alteradas dentro de um determinado volume de tecido em regiões afetadas pela doença: o septum, parte do hipocampo e do giro denteado, usando investigação estereológica sem viés. Como em todos os casos onde se utiliza a microscopia para realizar tais estimativas, não é possível contar todas as células dentro da região de interesse. Para contornar esse dilema de obter estimativas confiáveis (que se aproximam do real) a partir de uma diminuta fração amostral, é necessário a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a terceira dimensão. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (Schmitz and Hof, 2005). Entretanto, com esse procedimento, o máximo que se pode pretender é realizar estimativas que se aproximem ao máximo do que seria esperado (Cruz-Orive, 1994; Schmitz, 1998).

Para alcançar esse objetivo existem dois métodos estereológicos: o fracionador óptico já descrito e o método que estima o número total de células multiplicando a densidade média de células pelo volume da região de interesse (Schmitz and Hof, 2000). Em estudo recente entretanto ficou evidente que as

estimativas do número total de objetos de interesse obtidas a partir do fracionador óptico, são do ponto de vista estatístico e do ponto de vista do esforço empreendido, mais eficientes do que as estimativas a partir da densidade e volume (Schmitz and Hof, 2000) Além disso avaliou-se igualmente várias maneiras de se estimar o erro em amostras simuladas por computador de modo a encontrar um modo de calcular o coeficiente de erro que mais se aproximasse do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (Glaser and Wilson, 1998).

Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total ($CE^2/CV^2 < 0.5$, onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e $CV = (\text{Desvio Padrão}/\text{Média})$). No presente trabalho a relação CE^2/CV^2 esteve sempre abaixo de 0.5, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens. Duas exceções a essa regra geral foram detectadas. Nesses casos em particular a regra geral não é útil para avaliar erros metodológicos intrínsecos ao sistema de amostragem em função do fato de que o coeficiente de variação biológica e o coeficiente de erro são muito pequenos perdendo o sentido aplicar a regra geral (Slomianka and West, 2005).

A outra maneira que se empregou para se avaliar os erros relacionados à escolha da matriz amostral foi o cálculo da variação biológica definida como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (onde CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica) expresso em valor percentual do coeficiente de variação. Considera-se que o coeficiente de erro é adequado sempre que ele contribui menos

do que a variação biológica para o coeficiente global de variação. Em geral a relação previamente descrita $CE^2/CV^2 < 0.05$ acompanha esse parâmetro havendo igualmente exceções que confirmam a regra.

Entretanto mesmo com todos esses cuidados a incerteza nas estimativas ainda permanece e é decorrente de outras fontes de erro possíveis como aqueles introduzidos pelos pré-supostos do observador acerca dos grupos experimentais, pelas alterações induzidas nas secções pelo processamento do tecido, pela ambigüidade no reconhecimento de áreas ou dos objetos de interesse e pela definição dos planos de foco superior e inferior da secção. Para minimizar esse tipo de incerteza é necessário executar uma série de procedimentos controle como ensaios duplos cegos, escolhas adequadas no tipo de processamento tecidual incluindo fixação, plano de corte, imunohistoquímicas seletivas, garantindo a cada passo que todas as regiões da estrutura tenham a mesma probabilidade de contribuir para a amostra, reduzindo a ambigüidade no reconhecimento dos limites da região, assim como dos objetos da contagem.

As estimativas do número de neurônios do giro denteado do camundongo da variedade C57Bl6J são um bom exemplo dessas dificuldades e têm gerado resultados com grande variação (Fabricius et al., 2008; Kempermann et al., 1997; Schmitz et al., 2002; West, 1993). Talvez uma das principais diferenças nessas estimativas decorra do fato de que a maioria delas não empregou imunomarcacão seletiva para neurônios tornando difícil o preenchimento do requisito de inambigüidade na distinção entre neurônios pequenos e células da glia particularmente nos trabalhos que utilizaram a coloração de Nissl. A comparação seletiva das estimativas feitas para o total de células granulares empregando o

marcador seletivo calbindina na variedade C57Bl6J (Kempermann et al., 1997) com as da variedade albina Suíça do presente trabalho revelou valores 70% mais altos: 270.000 células granulares na variedade C57Bl6J versus 153.000 na variedade Suíça albina). Por outro lado o número total de neurônios do giro denteado da fêmea adulta da variedade C57Bl6J incluindo a camada polimórfica e empregando a técnica de Nissl (violeta de cresila), estimado pelo fracionador óptico para um hemisfério foi de 356 mil neurônios (Fabricius et al., 2008). Esse último número supera as estimativas do presente trabalho em cerca de 87% mas está 42% aquém de outra estimativa feita para o giro denteado na mesma variedade empregando a mesma coloração e método estereológico (Witgen et al., 2006).

No presente trabalho adotou-se como requerido a imunomarcagem seletiva para neurônios (Neu-N), para astrócitos (GFAP) assim como histoquímicas específicas para identificação da microglia ativada (*Lycopersicum esculentum*) das redes perineuronais e dos limites arquitetônicos relacionados (*Wisteria floribunda*) minimizando a possibilidade de ambigüidades na identificação dos objetos e dos limites das áreas de interesse. Entretanto ainda que os números estimados para a variedade Suíça Albina no presente trabalho sejam menores do que os estimados para a variedade C57Bl6J essa é uma questão que ainda permanece para ser respondida em função das diferenças metodológicas aplicadas aos diferentes estudos.

Doença Prion e Doença de Alzheimer

Finalmente é útil e importante retomarmos a discussão da utilidade do modelo de neurodegeneração crônica associada à doença prion à luz de recentes descobertas relacionadas à doença de Alzheimer. Um grupo de pesquisadores da Universidade de Yale descobriu o que eles denominaram de “ligação surpreendente entre a doença de Alzheimer e a proteína Prion PrP^C” demonstrando que a proteína PrP^C, que quando alterada forma agregados em doenças prion, é um dos principais receptores celulares que os oligômeros da proteína β amilóide utilizam para induzir a inibição da plasticidade sináptica no hipocampo na doença de Alzheimer (Lauren et al., 2009). Em concordância, camundongos mutantes que não sintetizam a proteína PrP^C mas que possuem oligômeros da proteína β amilóide não apresentam inibição da potenciação de longo prazo no hipocampo, preservando a plasticidade sináptica (Lauren et al., 2009). Esses resultados abrem novas possibilidades de alvos terapêuticos voltados para essa interação e levantam a possibilidade de que as etapas subsequentes à interação dos oligômeros da proteína β amilóide com a proteína PrP^C, sejam compartilhados na doença prion e na doença de Alzheimer.

6. CONCLUSÃO

A doença prion induzida em fêmeas adultas do camundongo da variedade Suíça albina a partir da inoculação intrahipocampal bi-lateral do agente ME7 cursa com uma série de alterações que se assemelham em grande extensão às previamente descritas para a variedade C57Bl6J com algumas exceções:

6.1. Após a inoculação do agente ME7 instala-se sistematicamente processo de neurodegeneração crônica que afeta inicialmente as áreas do sistema límbico e do tálamo induzindo a morte dos animais inoculados após 26 semanas, 4 semanas mais tarde do que os da variedade C57Bl6J.

6.2. As alterações comportamentais tem em média curso temporal mais longo do que no C57Bl6J podendo dar origem à formação de subgrupos que evoluem de forma distinta: um grupo menor, mais sensível, onde a doença cursa mais rápido e os animais atingem a fase terminal em 22 semanas, e outro maior e menos sensível, onde os animais atingem a fase terminal em 26 semanas.

6.3. Análise qualitativa seguida de análise estereológica empregando o fracionador óptico revelou maior número de microglias ativadas e de astrócitos reativos assim como maior redução do número de redes perineuronais nos estágios iniciais da doença na região septal ao invés do hipocampo.

6.4. Na região septal foram encontradas correlações inversas e lineares, simples, entre as estimativas do número de astrócitos e de microglias que crescem com a progressão da doença e as redes perineuronais que decrescem em número à medida que a doença avança.

6.5. Tal como na variedade C57Bl6J não se encontrou diferença nas estimativas do número de neurônios nos animais inoculados com o agente ME7 em relação aos inoculados com homogenado cerebral normal pelo menos até a 18^a semana, em nenhuma das regiões estudadas.

6.6 A utilização de marcadores arquitetônicos e hodológicos permitiram evidenciar sem ambigüidades os objetos e os limites das áreas de interesse confirmando resultados previamente descritos para a variedade C57Bl6J.

6.7 O número total de neurônios estimados para o giro denteado na fêmea adulta da variedade C57Bl6J varia entre 70 e 100% a mais do que o número equivalente estimado para a variedade Suíça albina dependendo da metodologia e da coloração empregada para definição dos objetos de interesse.

REFERÊNCIAS

AMARAL, D. G. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. **J Comp Neurol**, v.182, n.4 Pt 2, Dec 15, p.851-914. 1978.

AMARAL, D. G., SCHARFMAN, H. E. e LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, v.163, p.3-22. 2007.

AMBROGINI, P., LATTANZI, D., CIUFFOLI, S., AGOSTINI, D., BERTINI, L., STOCCHI, V., SANTI, S. e CUPPINI, R. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. **Brain Res**, v.1017, n.1-2, Aug 13, p.21-31. 2004.

ANDERSEN, B. B. e GUNDERSEN, H. J. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. **J Microsc**, v.196, n.Pt 1, Oct, p.69-73. 1999.

APOSTOLOVA, L. G. e THOMPSON, P. M. Mapping progressive brain structural changes in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neuropsychologia**, v.46, n.6, p.1597-612. 2008.

ARNAL, J. F., DINH-XUAN, A. T., PUEYO, M., DARBLADE, B. e RAMI, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. **Cell Mol Life Sci**, v.55, n.8-9, Jul, p.1078-87. 1999.

AZCOITIA, I., PEREZ-MARTIN, M., SALAZAR, V., CASTILLO, C., ARIZNAVARRETA, C., GARCIA-SEGURA, L. M. e TRESGUERRES, J. A. Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. **Neurobiol Aging**, v.26, n.5, May, p.697-703. 2005.

BANDTLOW, C. E. e ZIMMERMANN, D. R. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. **Physiol Rev**, v.80, n.4, Oct, p.1267-90. 2000.

BELICHENKO, P. V., MIKLOSSY, J., BELSER, B., BUDKA, H. e CELIO, M. R. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurobiol Dis**, v.6, n.4, Aug, p.269-79. 1999.

BENEYTO, M., RUEDA, J., MERCHAN, J. A. e PRIETO, J. J. Specific staining of nonpyramidal cell populations of the cerebral cortex by lectin cytochemistry on semithin sections. **Brain Res Bull**, v.49, n.4, Jul 1, p.251-62. 1999.

BETMOUNI, S., DEACON, R. M. J., RAWLINS, J. N. P. e PERRY, V. H. Behavioural consequences of prion disease targeted to the hippocampus in a mouse model of scrapie. . **Psychobiology** v.27, p.63–71. 1999.

BLACKSTAD, T. W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J Comp Neurol**, v.105, n.3, Oct, p.417-537. 1956.

BLOCK, M., ZECCA, L. e JS, H. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Review Neuroscience**, v.8, p.57-69. 2007.

BOBINSKI, M., WEGIEL, J., TARNAWSKI, M., BOBINSKI, M., REISBERG, B., DE LEON, M., MILLER, D. e WISNIEWSKI, H. Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.56, n.4, p.414-20. 1997.

BOCHE, D., CUNNINGHAM, C., DOCAGNE, F., SCOTT, H. e PERRY, V. H. TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. **Neurobiol Dis**, v.22, n.3, Jun, p.638-50. 2006.

BOHME, G., BON, C., LEMAIRE, M., REIBAUD, M., PIOT, O., STUTZMANN, J., DOBLE, A. e BLANCHARD, J. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proceedings of the Natl Acad Sci USA**, v.90, p.9191-4. 1993.

BONTHIUS, D. J., MCKIM, R., KOELE, L., HARB, H., KARACAY, B., MAHONEY, J. e PANTAZIS, N. J. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. **Brain Res Brain Res Protoc**, v.14, n.1, Nov, p.45-57. 2004.

BOUCSEIN, C., KETTENMANN, H. e NOLTE, C. Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. **Eur J Neurosci**, v.12, n.6, Jun, p.2049-58. 2000.

BRAAK, H. e BRAAK, E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. **Brain Pathol**, v.1, n.3, Apr, p.213-6. 1991.

BRANDT, M. D., JESSBERGER, S., STEINER, B., KRONENBERG, G., REUTER, K., BICK-SANDER, A., VON DER BEHRENS, W. e KEMPERMANN, G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. **Mol Cell Neurosci**, v.24, n.3, Nov, p.603-13. 2003.

BROOM, K. A., ANTHONY, D. C., LOWE, J. P., GRIFFIN, J. L., SCOTT, H., BLAMIRE, A. M., STYLES, P., PERRY, V. H. e SIBSON, N. R. MRI and MRS alterations in the preclinical phase of murine prion disease: association with neuropathological and behavioural changes. **Neurobiol Dis**, v.26, n.3, Jun, p.707-17. 2007.

BROWN, D. Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. **Folia Neuropathol** v.43, p.229-243. 2005.

BROWN, D. R. e KRETZSCHMAR, H. A. Microglia and prion disease: a review. **Histol Histopathol**, v.12, n.3, Jul, p.883-92. 1997.

BROWN, T. e ZADOR, A. **Hippocampus** New York, NY: Oxford University Press. 1990 346-387 p. (The Synaptic Organization of the Brain)

BRUCE, M., MCCONNELL, I., FRASER, H. e DICKINSON, A. The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. . **J Gen Virol** v.72, p.595–603. 1991.

BRUCKNER, G., GROSCHE, J., HARTLAGE-RUBSAMEN, M. e AL., E. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. **J Chem Neuroanat**, v.26, p.37-50. 2003.

BRUCKNER, G., GROSCHE, J., HARTLAGE-RUBSAMEN, M., SCHMIDT, S. e SCHACHNER, M. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. **J Chem Neuroanat**, v.26, n.1, Aug, p.37-50. 2003.

BRUCKNER, G., HARTIG, W., SEEGER, J., RUBSAMEN, R., REIMER, K. e BRAUER, K. Cortical perineuronal nets in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): a distribution pattern contrasting with that shown in placental mammals. **Anat Embryol (Berl)**, v.197, n.4, Apr, p.249-62. 1998.

BRUCKNER, G., PAVLICA, S., MORAWSKI, M., PALACIOS, A. G. e REICHENBACH, A. Organization of brain extracellular matrix in the Chilean fat-tailed mouse opossum *Thylamys elegans* (Waterhouse, 1839). **J Chem Neuroanat**, v.32, n.2-4, Dec, p.143-58. 2006.

BRUCKNER, G., SZEOKE, S., PAVLICA, S., GROSCHE, J. e KACZA, J. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. **Neuroscience**, v.138, n.2, p.365-75. 2006.

BUCKMASTER, P. S., OTERO-CORCHON, V., RUBINSTEIN, M. e LOW, M. J. Heightened seizure severity in somatostatin knockout mice. **Epilepsy Res**, v.48, n.1-2, Jan, p.43-56. 2002.

BURWELL, R. D. e AMARAL, D. G. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. **J Comp Neurol**, v.391, n.3, Feb 16, p.293-321. 1998.

CADACIO, C. L., MILNER, T. A., GALLAGHER, M. e PIERCE, J. P. Hilar neuropeptide Y interneuron loss in the aged rat hippocampal formation. **Exp Neurol**, v.183, n.1, Sep, p.147-58. 2003.

CAGNIN, A., BROOKS, D. J., KENNEDY, A., GUNN, R. N., MYERS, R., TURKHEIMER, F. E., JONES, T. e BANATI, R. B. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. **Lancet**, v.358, p.461-467. 2001.

CELIO, M. R. e BLUMCKE, I. Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. **Brain Res Brain Res Rev**, v.19, n.1, Jan, p.128-45. 1994.

CELIO, M. R. e CHIQUET-EHRISMANN, R. 'Perineuronal nets' around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin. **Neurosci Lett**, v.162, n.1-2, Nov 12, p.137-40. 1993.

CELIO, M. R., SPREAFICO, R., DE BIASI, S. e VITELLARO-ZUCCARELLO, L. Perineuronal nets: past and present. **Trends Neurosci**, v.21, n.12, Dec, p.510-5. 1998.

CHEVALIER, G., DENIAU, J. M. e MENETREY, A. Evidence that biocytin is taken up by axons. **Neuroscience Letters**, v.140, n.2, p.197-199. 1992.

CHOI, Y., KIM, J., LEE, H., JIN, J., CHOI, E., CARP, R. e KIM, Y. Induction of heme oxygenase-1 in the brains of scrapie-infected mice. **Neurosci Lett**, v.289, p.173–6. 2000.

CLARK, P. J., BRZEZINSKA, W. J., THOMAS, M. W., RYZHENKO, N. A., TOSHKOV, S. A. e RHODES, J. S. Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. **Neuroscience**, v.155, n.4, Sep 9, p.1048-58. 2008.

COSTA, E. P., DEL DEBBIO, C. B., CINTRA, L. C., DA FONTOURA COSTA, L., HAMASSAKI, D. E. e SANTOS, M. F. Jararhagin, a snake venom metalloprotease-disintegrin, activates the Rac1 GTPase and stimulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells. **Toxicon**, v.52, n.2, Aug 1, p.380-4. 2008.

CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiol Aging**, v.15, n.3, May-Jun, p.377-8; discussion 379-80. 1994.

CUNNINGHAM, C. **Mouse behavioral studies and what they can teach us about prion diseases**. New York, NY. 2005. 111-137 p.

CUNNINGHAM, C., DEACON, R., CHAN, K., BOCHE, D., RAWLINS, J. e PERRY, V. Neuropathologically distinct strains give rise to similar temporal profiles of behavioral impairments **Neurobiol. Dis.**, v.18, p.258-269. 2005.

CUNNINGHAM, C., R. , DEACON, H., WELLS, D., BOCHE, S. WATERS, C. P. DINIZ, H. SCOTT, J. N. RAWLINS e PERRY, V. H. Synaptic changes characterize early behavioural changes in the ME7 model of murine prion disease. **Eur. J. Neurosci.** , v.17, p.2147–2155. 2003.

CUNNINGHAM, C., WILCOCKSON, D., CAMPION, S., LUNNON, K. e PERRY, V. Central and Systemic Endotoxin Challenges Exacerbate the Local Inflammatory Response and Increase Neuronal Death during Chronic Neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v.25, n.40, p.9275–9284 2005.

DARLINGTON, P. J., GOLDMAN, J. S., CUI, Q. L., ANTEL, J. P. e KENNEDY, T. E. Widespread immunoreactivity for neuronal nuclei in cultured human and rodent astrocytes. **J Neurochem**, v.104, n.5, Mar, p.1201-9. 2008.

DE JONG, G. I., JANSEN, A. S. P., HORVATH, E., GISPEN, W. H. e LUITEN, P. G. M. Nimodipine effects on cerebral microvessels and sciatic nerve in aging rats. **Neurobiol. Aging**, v.13, n.1, p.73–81. 1991.

DE LA TORRE, J. e STEFANO, G. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. **Brain Res Brain Res Rev**, v.34, p.119-136. 2000.

DEACON, R., CROUCHER, A. e RAWLINS, J. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. . **Behav Brain Res**, v.132, p.203-213. 2002.

DEACON, R., RALEY, J., PERRY, V. e RAWLINS, J. Burrowing into prion disease. **Neuroreport**, v.12, p.2053-2057. 2001.

DEACON, R., REISEL, D., PERRY, V., NICHOLAS, J. e RAWLINS, P. Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice. **Behavioural Brain Research** v.157, p.99-105. 2005.

DEACON, R. M., RALEY, J. M., PERRY, V. H. e RAWLINS, J. N. Burrowing into prion disease. **Neuroreport**, v.12, p.2053-2057. 2001.

DELGADO, J. Y., COBA, M., ANDERSON, C. N., THOMPSON, K. R., GRAY, E. E., HEUSNER, C. L., MARTIN, K. C., GRANT, S. G. e O'DELL, T. J. NMDA receptor activation dephosphorylates AMPA receptor glutamate receptor 1 subunits at threonine 840. **J Neurosci**, v.27, n.48, Nov 28, p.13210-21. 2007.

DELLER, T., MARTINEZ, A., NITSCH, R. e FROTSCHER, M. A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. **J Neurosci**, v.16, n.10, May 15, p.3322-33. 1996.

DHINGRA, D., PARLE, M. e KULKARNI, S. K. Comparative brain cholinesterase-inhibiting activity of Glycyrrhiza glabra, Myristica fragrans, ascorbic acid, and metrifonate in mice. **J Med Food**, v.9, n.2, Summer, p.281-3. 2006.

DINIZ, J., NUNES, M., TRAVASSOS DA ROSA, A., CRUZ, A., DE SOUZA, W., MEDEIROS, D., CHIANG, J. e VASCONCELOS, P. Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (Culicoides spp) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus Bracorhabdovirus. **Arch. Virol.**, v.151, p. 2519-2527. 2006.

DINIZ, J., SANTOS, Z., BRAGA, M., DIAS, A., SILVA, D., MEDEIROS, D., BARROS, V., CHIANG, J., ZOGHBI, K., QUARESMA, J., TAKIYA, C., MOURA NETO, V., SOUZA, W., VASCONCELOS, P. e PICANCO DINIZ, C. Early and Late Pathogenic Events of Newborn Mice Encephalitis Experimentally Induced by Itacaiunas and Curionopolis Bracorhabdoviruses Infection. **PLOS-One**, v.3, n.3, p.e1733. 2008.

DOLLEMAN-VAN DER WEEL, M. J. e WITTER, M. P. Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. **Neurosci Lett**, v.278, n.3, Jan 14, p.145-8. 2000.

DOLLEMAN-VAN DER WEEL, M. J., WOUTERLOOD, F. G. e WITTER, M. P. Multiple anterograde tracing, combining Phaseolus vulgaris leucoagglutinin with rhodamine- and biotin-conjugated dextran amine. **J Neurosci Methods**, v.51, n.1, Jan, p.9-21. 1994.

DOLORFO, C. L. e AMARAL, D. G. Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. **J Comp Neurol**, v.398, n.1, Aug 17, p.25-48. 1998a.

DOLORFO, C. L. e AMARAL, D. G. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. **J Comp Neurol**, v.398, n.1, Aug 17, p.49-82. 1998b.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochim Biophys Acta** v.1450, p.191-231. 1999.

DORPH-PETERSEN, K. A., NYENGAARD, J. R. e GUNDERSEN, H. J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. **J Microsc**, v.204, n.Pt 3, Dec, p.232-46. 2001.

EDGAR, M. A. e ROSENBLUM, M. K. The differential diagnosis of central nervous system tumors: a critical examination of some recent immunohistochemical applications. **Arch Pathol Lab Med**, v.132, n.3, Mar, p.500-9. 2008.

EICHENBAUM, H. Remembering: functional organization of the declarative memory system. **Curr Biol**, v.16, n.16, Aug 22, p.R643-5. 2006.

EICHENBAUM, H. E., YONELINAS, A. P. e RANGANATH, C. The medial temporal lobe and recognition memory. **Annu Rev Neurosci**, v.30, p.123–152. 2007.

EIKELENBOOM, P., BATE, C., VAN GOOL, W. A., M., H. J. J., ROZEMULLER, J. M., VEERHUIS, R. e WILLIAMS, A. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease and Prion Disease. **GLIA** v.40, p.232-239. 2002.

ELSTON, G. N., DEFELIPE, J., ARELLANO, J. I., GONZILEZ-ALBO, M. C. e ROSA, M. G. Variation in the spatial relationship between parvalbumin immunoreactive interneurons and pyramidal neurons in rat somatosensory cortex. **Neuroreport**, v.10, n.14, Sep 29, p.2975-9. 1999.

ELVANDER, E., SCHOTT, P. A., SANDIN, J., BJELKE, B., KEHR, J., YOSHITAKE, T. e OGREN, S. O. Intraseptal muscarinic ligands and galanin: influence on hippocampal acetylcholine and cognition. **Neuroscience**, v.126, n.3, p.541-57. 2004.

ENESCO, H. E. e SAMBORSKY, J. Influence of dietary protein restriction on cell number, cell size and growth of mouse organs during the course of aging. **Arch Gerontol Geriatr**, v.5, n.3, Oct, p.221-33. 1986.

ERICKSON, C. A. e BARNES, C. A. The neurobiology of memory changes in normal aging. **Exp Gerontol**, v.38, n.1-2, Jan-Feb, p.61-9. 2003.

FABRICIUS, K., WORTWEIN, G. e PAKKENBERG, B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. **Brain Struct Funct**, v.212, n.5, Feb, p.403-16. 2008.

FARKAS, E. e LUITEN, P. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology** v.64 p.575-611. 2001.

FELTON, L. M., CUNNINGHAM, C., RANKINE, E. L., WATERS, S., BOCHE, D. e PERRY, V. H. MCP-1 and murine prion disease: separation of early behavioural dysfunction from overt clinical disease. **Neurobiol Dis**, v.20, n.2, Nov, p.283-95. 2005.

FIALA, J. C. e HARRIS, K. M. Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes. **J Am Med Inform Assoc**, v.8, n.1, Jan-Feb, p.1-16. 2001.

FISCHER, W., GAGE, F. H. e BJORKLUND, A. Degenerative Changes in Forebrain Cholinergic Nuclei Correlate with Cognitive Impairments in Aged Rats. **Eur J Neurosci**, v.1, n.1, Jan, p.34-45. 1989.

FLEMING, I. e BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.284, n.1, Jan, p.R1-12. 2003.

FORD, S. M. e DAVIS, L. C. Systematics and body size: implications for feeding adaptations in New World monkeys. **Am J Phys Anthropol**, v.88, n.4, Aug, p.415-68. 1992.

FRANKLIN, S., LOVE, S., GREENE, J. e BETMOUNI, S. Loss of Perineuronal Net in ME7 Prion Disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.67, n.3, p.189-199. 2008.

GARDELLA, D., HATTON, W. J., RIND, H. B., ROSEN, G. D. e VON BARTHELD, C. S. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. **J Neurosci Methods**, v.124, n.1, Mar 30, p.45-59. 2003.

GARRIDO, R. e MENEZES, P. Brazil is aging: good and bad news from an epidemiological perspective **Rev Bras Psiquiatr** v.24, n.Supl, p.3-6. 2002.

GEINISMAN, Y., DETOLEDO-MORRELL, L., MORRELL, F. e HELLER, R. E. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. **Prog Neurobiol**, v.45, n.3, Feb, p.223-52. 1995.

GIESE, A., GROSCHUP, M. H., HESS, B. e KRETZSCHMAR, H. A. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. **Brain Pathol.**, v.5, p.213-221. 1995.

GLASER, E. M. e WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **Journal of Microscopy**, v.192, p.163-171. 1998.

GLASER, J. R. e GLASER, E. M. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. **J Chem Neuroanat**, v.20, n.1, Oct, p.115-26. 2000.

GLATZEL, M., STOECK, K., SEEGER, H., LUHRS, T. e AGUZZI, A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. **Arch Neurol**, v.62, n.4, Apr, p.545-52. 2005.

GOLGI, C. On the structure of nerve cells. 1898. **J Microsc**, v.155, n.Pt 1, Jul, p.3-7. 1989.

GOMES-LEAL, W., MARTINS, L., DINIZ, J., SANTOS, Z., BORGES, J., MACEDO, C., MEDEIROS, A., PAULA, L., GUIMARÃES, J., FREIRE, M., VASCONCELOS, P. e PICANÇO-DINIZ, C. Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally infected newborn mice. **Acta Tropica**, v.97, n.2, p.126-139. 2006.

GRIFFIN, W., YERALAN, O., SHENG, J., BOOP, F., MRAK, R., ROVNAGHI, C., BURNETT, B., FEOKTISTOVA, A. e VAN ELDIK, L. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 in human temporal lobe epilepsy. **J Neurochem** v.65, p.228–33. 1995.

GUENTCHEV, M., GROSCHUP, M. H., KORDEK, R., LIBERSKI, P. P. e BUDKA, H. Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. **Brain Pathol**, v.8, n.4, Oct, p.615-23. 1998.

GUENTCHEV, M., VOIGTLANDER, T., HABERLER, C., GROSCHUP, M. e BUDKA, H. Evidence for oxidative stress in experimental prion disease. **Neurobiol Dis**, v.7, p.270–73. 2000.

GUENTCHEV, M., WANSCHITZ, J., VOIGTLANDER, T., FLICKER, H. e BUDKA, H. Selective neuronal vulnerability in human prion diseases. Fatal familial insomnia differs from other types of prion diseases. **Am J Pathol**, v.155, n.5, Nov, p.1453-7. 1999.

GUENTHER, K., DEACON, R. M., PERRY, V. H. e RAWLINS, J. N. Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone. **Eur. J. Neurosci.**, v.14, p.401-409. 2001.

HALEY, J., WILCOX, G. e CHAPMAN, P. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **Neuron** v.8, p.211-216. 1992.

HARTIG, W., BRAUER, K. e BRUCKNER, G. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. **Neuroreport**, v.3, n.10, Oct, p.869-72. 1992.

HARTIG, W., DEROUICHE, A., WELT, K., BRAUER, K., GROSCHE, J., MADER, M., REICHENBACH, A. e BRUCKNER, G. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly

surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. **Brain Res**, v.842, n.1, Sep 18, p.15-29. 1999.

HARTIG, W., KLEIN, C., BRAUER, K., SCHUPPEL, K. F., ARENDT, T., BIGL, V. e BRUCKNER, G. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. **Neurobiol Aging**, v.22, p.25-33. 2001.

HAUSEN, D., BRUCKNER, G., DRLICEK, M., HARTIG, W., BRAUER, K. e BIGL, V. Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. **Neuroreport**, v.7, n.11, Jul 29, p.1725-9. 1996.

HEAD, E., LIU, J., HAGEN, T. M., MUGGENBURG, B. A., MILGRAM, N. W., AMES, B. N. e COTMAN, C. W. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. **J Neurochem**, v.82, n.2, Jul, p.375-81. 2002.

HENDRY, S. H., JONES, E. G., HOCKFIELD, S. e MCKAY, R. D. Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. **J Neurosci**, v.8, n.2, Feb, p.518-42. 1988.

HOCKFIELD, S., KALB, R. G., ZAREMBA, S. e FRYER, H. Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v.55, p.505-14. 1990.

HORNSHAW, M. P., MCDERMOTT, J. R., CANDY, J. M. e LAKEY, J. H. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. **Biochem Biophys Res Commun**, v.214, n.3, Sep 25, p.993-9. 1995.

HOUSER, C. R. Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. **Prog Brain Res**, v.163, p.217-32. 2007.

HOWARD, C. e REED, M. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. 2005.

HUNT, D., COFFIN, R. S. e ANDERSON, P. N. The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. **J Neurocytol**, v.31, n.2, Feb, p.93-120. 2002.

HUNTER, A. J., CAULFIELD, M. P. e KIMBERLIN, R. H. Learning ability of mice infected with different strains of scrapie. . **Physiol. Behav.**, v.36, p.1089-1092. 1986.

INGRAM, D. K., LONDON, E. D. e GOODRICK, C. L. Age and neurochemical correlates of radial maze performance in rats. **Neurobiol Aging**, v.2, n.1, Spring, p.41-7. 1981.

IRIZARRY, M., MCNAMARA, M., FEDORCHAK, K., HSIAO, K. e HYMAN, B. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.56, p.965–973. 1997.

JEFFREY M, HALLIDAY WG, BELL J, JOHNSTON AR, MACLEOD NK, INGHAMC, SAYERS AR, BROWN DA e JR., F. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapieinfected murine hippocampus. **Neuropathol Appl Neurobiol** v.26, p.41– 54. 2000.

JEFFREY, M., GOODBRAND, I. e GOODSIR, C. Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. **Micron** n.26, p.277–298. 1995.

JEFFREY, M., HALLIDAY, W. G., BELL, J., JOHNSTON, A. R., MACLEOD, N. K., INGHAM, C., SAYERS, A. R., BROWN, D., A e FRASER, J. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie infected murine hippocampus. **Neuropathol Appl Neurobiol** v.26, p.41– 54. 2000.

JEFFREY, M., MARTIN, S., BARR, J., CHONG, A. e FRASER, J. R. Onset of accumulation of PrPres in murine ME7 scrapie in relation to pathological and PrP immunohistochemical changes
J. Comp. Pathol., v.124, p.20-28. 2001.

JIANG, M., KAKU, T., HADA, J. e HAYASHI, Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. **Brain Res** v.946, p.139–47. 2002.

JIANG, X., JOHNSON, R. R. e BURKHALTER, A. Visualization of dendritic morphology of cortical projection neurons by retrograde axonal tracing. **J Neurosci Methods**, v.50, n.1, Oct, p.45-60. 1993.

JOHN, N., KRUGEL, H., FRISCHKNECHT, R., SMALLA, K. H., SCHULTZ, C., KREUTZ, M. R., GUNDELFINGER, E. D. e SEIDENBECHER, C. I. Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. **Mol Cell Neurosci**, v.31, n.4, Apr, p.774-84. 2006.

KALARIA, R. N., MAESTRE, G. E., ARIZAGA, R., FRIEDLAND, R. P., GALASKO, D., HALL, K., LUCHSINGER, J. A., OGUNNIYI, A., PERRY, E. K., POTOCHNIK, F., PRINCE, M., STEWART, R., WIMO, A., ZHANG, Z. X. e ANTUONO, P. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol**, v.7, n.9, Sep, p.812-26. 2008.

KANEKO, M., SUGIYAMA, N., SASAYAMA, D., YAMAOKA, K., MIYAKAWA, T., ARIMA, K., TSUCHIYA, K., HASEGAWA, K., WASHIZUKA, S., HANIHARA, T., AMANO, N. e YAGISHITA, S. Prion disease causes less severe lesions in human hippocampus than other parts of brain. **Psychiatry and Clinical Neurosciences** v.62, p.264-270. 2008.

KANNAN, S., SAADANI-MAKKI, F., MUZIK, O., CHAKRABORTY, P., MANGNER, T. J., JANISSE, J., ROMERO, R. e CHUGANI, D. C. Microglial activation in perinatal rabbit brain induced by intrauterine inflammation: detection with ¹¹C-(R)-PK11195 and small-animal PET. **J Nucl Med**, v.48, n.6, Jun, p.946-54. 2007.

KEMPERMANN, G., GAST, D., KRONENBERG, G., YAMAGUCHI, M. e GAGE, F. H. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. **Development**, v.130, n.2, Jan, p.391-9. 2003.

KEMPERMANN, G., KUHN, H. G. e GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v.386, n.6624, Apr 3, p.493-5. 1997.

KESNER, R. P., LEE, I. e GILBERT, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. **Rev Neurosci**, v.15, n.5, p.333-51. 2004.

KEUKER, J. I., LUITEN, P. G. e FUCHS, E. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. **Neurobiol Aging**, v.24, n.1, Jan-Feb, p.157-65. 2003.

KIATIPATTANASAKUL, W., NAKAMURA, S., HOSSAIN, M. M., NAKAYAMA, H., UCHINO, T., SHUMIYA, S., GOTO, N. e DOI, K. Apoptosis in the aged dog brain. **Acta Neuropathol**, v.92, n.3, Sep, p.242-8. 1996.

KIM, J., JU, W., CHOI, J., CHOI, E., CARP, R., WISNIEWSKI, H. e KIM, Y. Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. **Brain Res Mol Brain Res**, v.73, p.17-27. 1999.

KIM, N., PARK, S., JIN, J., KWON, M., CHOI, E., CARP, R. e KIM, Y. Increased ferric iron content and iron-induced oxidative stress in the brains of scrapie-infected mice. **Brain Res**, v.884, p.98-103. 2000.

KING, M. A., LOUIS, P. M., HUNTER, B. E. e WALKER, D. W. Biocytin: a versatile anterograde neuroanatomical tract-tracing alternative. **Brain Res**, v.497, n.2, Sep 18, p.361-7. 1989.

KISHI, T., TSUMORI, T., YOKOTA, S. e YASUI, Y. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. **J Comp Neurol**, v.496, n.3, May 20, p.349-68. 2006.

KONSMAN, J., PARNET, P. e DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**, n.25, p.154-159. 2002.

KOOPMANS, G., BLOKLAND, A., VAN NIEUWENHUIJZEN, P. e PRICKAERTS, J. Assessment of spatial learning abilities of mice in a new circular maze. **Physiol Behav**, v.79, n.4-5, Sep, p.683-93. 2003.

KOVACS, G. e BUDKA, H. Prion Diseases: From Protein to Cell Pathology. **The American Journal of Pathology**, v.172, n.3, p.555-565. 2008.

KREUTZBERG, G. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v.19, p.312-318. 1996.

KUBINOVA, L. e JANACEK, J. Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images. **Microsc Res Tech**, v.53, n.6, Jun 15, p.425-35. 2001.

KUMAR, S. S. e BUCKMASTER, P. S. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. **Brain Res**, v.1142, Apr 20, p.54-60. 2007.

LAW, A., GAUTHIER, S. e QUIRION, R. Say NO to Alzheimer's disease. the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. **Brain Res Brain Res Rev**, v.35, p.73-96. 2001.

LERANTH, C. e HAJSZAN, T. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. **Prog Brain Res**, v.163, p.63-84. 2007.

LIM, C., BLUME, H. W., MADSEN, J. R. e SAPER, C. B. Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. **J Comp Neurol**, v.385, n.3, Sep 1, p.325-51. 1997.

LIPTON, P. A. e EICHENBAUM, H. Complementary roles of hippocampus and medial entorhinal cortex in episodic memory. **Neural Plast**, v.2008, p.258467. 2008.

LONG, J. M., KALEHUA, A. N., MUTH, N. J., CALHOUN, M. E., JUCKER, M., HENGEMIHLE, J. M., INGRAM, D. K. e MOUTON, P. R. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. **Neurobiol Aging**, v.19, n.5, Sep-Oct, p.497-503. 1998.

LONG, J. M., KALEHUA, A. N., MUTH, N. J., HENGEMIHLE, J. M., JUCKER, M., CALHOUN, M. E., INGRAM, D. K. e MOUTON, P. R. Stereological estimation of total microglia number in mouse hippocampus. **J Neurosci Methods**, v.84, n.1-2, Oct 1, p.101-8. 1998.

LORENZI, H. A. e REEVES, R. H. Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. **Brain Res**, v.1104, n.1, Aug 9, p.153-9. 2006.

LOVICK, T., BROWN, L. e KEY, B. Neurovascular relationships in hippocampal slices: physiological and anatomical studies of mechanisms underlying flow-metabolism coupling in intraparenchymal microvessels. **Neuroscience**, v.92 p.47-60. 1999.

LUCASSEN, P. J., WILLIAMS, A., CHUNG, W. C. e FRASER, H. Detection of apoptosis in murine scrapie. **Neuroscience Letters**, v.198, p.185-188. 1995.

LUITEN, P. G. M., DE JONG, G. I. e SCHUURMAN, T. Cerebrovascular, neuronal, and behavioral effects of long-term Ca²⁺ channel blockade in aging normotensive and hypertensive rat strains. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** , v.747, p.431–451. 1994.

MACLEOD, M., STEWART, G., ZEIDLER, M., WILL, R. e KNIGHT, R. Sensory features of variant Creutzfeldt-Jakob disease. **J Neurol**, v.249, p.706–711. 2002.

MAGAVI, S. S., LEAVITT, B. R. e MACKLIS, J. D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Nature**, v.405, n.6789, Jun 22, p.951-5. 2000.

MAGLOCZKY, Z. e FREUND, T. F. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. **Neuroscience**, v.56, n.2, Sep, p.317-35. 1993.

MAGLOCZKY, Z. e FREUND, T. F. Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. **Trends Neurosci**, v.28, n.6, Jun, p.334-40. 2005.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v.75, n.4, Dec, p.469-86. 2003.

MANDYBUR, T. e CHUIRAZZI, C. Astrocytes and the plaques of Alzheimer's disease. **Neurology** v.40, p.635–639. 1990.

MARKOWSKA, A. L., OLTON, D. S. e GIVENS, B. Cholinergic manipulations in the medial septal area: age-related effects on working memory and hippocampal electrophysiology. **J Neurosci**, v.15, n.3 Pt 1, Mar, p.2063-73. 1995.

MARTIN, M. M., HORN, K. L., KUSMAN, K. J. e WALLACE, D. G. Medial septum lesions disrupt exploratory trip organization: evidence for septohippocampal involvement in dead reckoning. **Physiol Behav**, v.90, n.2-3, Feb 28, p.412-24. 2007.

MASULLO, C. e MACHI, G. Resistance of the hippocampus in Creutzfeldt-Jakob disease **Clin Neuropathol**, v.16, p.37-44. 1997.

MATHIEU, M. e CHABRY, J. Neurons and Astrocytes Respond to Prion Infection by Inducing Microglia Recruitment. **The Journal of Neuroscience**, v.24, n.3, p.620–627. 2004.

MAYHEW, T. M. e GUNDERSEN, H. J. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **J Anat**, v.188 (Pt 1), Feb, p.1-15. 1996.

MCGEER, P., ITAGAKI, S., TAGO, H. e MCGEER, E. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. . **Neurosc Lett**, n.79, p.195-200. 1987.

MINGHETTI, L., GRECO, A., CARDONE, F., PUOPOLO, M., LADOGANA, A., ALMONTI, S., CUNNINGHAM, C., PERRY, V., POCCHIARI, M. e LEVI, G. Increased brain synthesis of prostaglandin E2 and F2-isoprostane in human and experimental transmissible spongiform encephalopathies. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.59, p.866-71. 2000

MIYATA, S., NISHIMURA, Y., HAYASHI, N. e OOHIRA, A. Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. **Neuroscience**, v.136, n.1, p.95-104. 2005.

MONTECOT, C., RONDI-REIG, L., SPRINGHETTI, V., SEYLAZ, J. e PINARD, E. Inhibition of neuronal (type 1) nitric oxide synthase prevents hyperaemia and hippocampal lesions resulting from kainate-induced seizures. **Neuroscience**, v.84, p.791-800. 1998.

MORRISON, J. H. e HOF, P. R. Life and death of neurons in the aging brain. **Science**, v.278, n.5337, Oct 17, p.412-9. 1997.

MOUTON, P. R., LONG, J. M., LEI, D. L., HOWARD, V., JUCKER, M., CALHOUN, M. E. e INGRAM, D. K. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. **Brain Res**, v.956, n.1, Nov 22, p.30-5. 2002.

MRAK, R., SHENG, J. e GRIFfIN, W. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.55, p.273-279. 1996.

MRAKA, R. e GRIFfIN, W. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging** v.22, p.915-922. 2001.

MULLIGAN, K. A., VAN BREDERODE, J. F. e HENDRICKSON, A. E. The lectin *Vicia villosa* labels a distinct subset of GABAergic cells in macaque visual cortex. **Vis Neurosci**, v.2, n.1, p.63-72. 1989.

MURAKAMI, T., MURAKAMI, T., SATO, H., MUBARAK, W. A., OHTSUKA, A. e ABE, K. Perineuronal nets of proteoglycans in the adult mouse brain, with special reference to their reactions to Gomori's ammoniacal silver and Ehrlich's methylene blue. **Arch Histol Cytol**, v.62, n.1, Mar, p.71-81. 1999.

NYENGAARD, J. R. e GUNDERSEN, H. J. Direct and efficient stereological estimation of total cell quantities using electron microscopy. **J Microsc**, v.222, n.Pt 3, Jun, p.182-7. 2006.

OESCH, B., WESTAWAY, D., M, W., MCKINLEY, M., KENT SB e AL., E. A cellular gene encodes PrP 27–30 protein. **Cell**, v.40, p.735-746. 1985.

OVADIA, H., ROSENMAN, H., SHEZEN, E., HALIMI, M., OFRAN, I. e GABIZON, R. Effect of scrapie infection on the activity of neuronal nitric-oxide synthase in brain and neuroblastoma cells. v.271, p.16856-16861. 1996.

PAXINOS, G. e FRANKLIN, K. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. London, UK: Academic Press. 2001

PERRY, V. H., C. CUNNINGHAM e BOCHE, D. Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. **Curr. Opin. Neurol.**, v.15, p.349–354. 2002.

PETERSON, D. A. Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures. **Methods**, v.18, n.4, Aug, p.493-507. 1999.

PHILLIPS, C. G., ZEKI, S. e BARLOW, H. B. Localization of function in the cerebral cortex. Past, present and future. **Brain**, v.107 (Pt 1), Mar, p.327-61. 1984.

PICANCO-DINIZ, C. W., BOCHE, D., GOMES-LEAL, W., PERRY, V. H. e CUNNINGHAM, C. Neuropil and neuronal changes in hippocampal NADPH-diaphorase histochemistry in the ME7 model of murine prion disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v.30, n.3, Jun, p.292-303. 2004.

PIKE, C., CUMMINGS, B. e COTMAN, C. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. **Exp Neurol**, v.132, p.172-917. 1995.

PREDIGER, R. D., MEDEIROS, R., PANDOLFO, P., DUARTE, F. S., PASSOS, G. F., PESQUERO, J. B., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. e TAKAHASHI, R. N. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v.151, n.3, Feb 6, p.631-43. 2008.

PRINCE, M., ACOSTA, D., ALBANESE, E., ARIZAGA, R., FERRI, C. P., GUERRA, M., HUANG, Y., JACOB, K. S., JIMENEZ-VELAZQUEZ, I. Z., RODRIGUEZ, J. L., SALAS, A., SOSA, A. L., SOUSA, R., UWAKWE, R., VAN DER POEL, R., WILLIAMS, J. e WORTMANN, M. Ageing and dementia in low and middle income countries-Using research to engage with public and policy makers. **Int Rev Psychiatry**, v.20, n.4, Aug, p.332-43. 2008.

PRUSINER, S. Molecular biology of prion diseases. **Science**, v.252, p.1515-1522. 1991.

QIN, K., YANG, D. S., YANG, Y., CHISHTI, M. A., MENG, L. J., KRETZSCHMAR, H. A., YIP, C. M., FRASER, P. E. e WESTAWAY, D. Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. **J Biol Chem**, v.275, n.25, Jun 23, p.19121-31. 2000.

QIU, C., DE RONCHI, D. e FRATIGLIONI, L. The epidemiology of the dementias: an update. **Curr Opin Psychiatry**, v.20, n.4, Jul, p.380-5. 2007.

RACHIDI, W., MANGE, A., SENATOR, A., GUIRAUD, P., RIONDEL, J., BENBOUBETRA, M., FAVIER, A. e LEHMANN, S. Prion infection impairs copper binding of cultured cells. **J Biol Chem**, v.278, n.17, Apr 25, p.14595-8. 2003.

RAUCH, U. Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. **Cell Tissue Res**, v.290, n.2, Nov, p.349-56. 1997.

REINER, A., VEENMAN, C. L., MEDINA, L., JIAO, Y., DEL MAR, N. e HONIG, M. G. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. **J Neurosci Methods**, v.103, n.1, Nov 15, p.23-37. 2000.

REISBERG, B., FINKEL, S., OVERALL, J., SCHMIDT-GOLLAS, N., KANOWSKI, S., LEHFED, H., HULLA, F., SCLAN, S., WILMS, H., HEININGER, K., HINDMARCH, I., STEMLER, M., POON, L., KLUGER, A., COOLER, C., BERGENER, M., HUGONTO-DIENER, L., ROBERT, P., ANTIPOLIS, S. e ERZIGKEIT, H. The Alzheimer's disease activity of dayling living international scale (ADL-IS). **Int Psychogeriatr**, v.13, p.163-181. 2001.

ROLLS, E. T. e KESNER, R. P. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. **Prog Neurobiol**, v.79, n.1, May, p.1-48. 2006.

ROSENE, D. L. e VAN HOESEN, G. W. **The Hippocampal Formation of the Primate Brain: a review of some comparative aspects of cytoarchitecture and Connections** v.6. 1987. 345-456 p. (Cerebral Cortex: Further Aspects of Cortical Function, including Hippocampus vol 6)

RUOSLAHTI, E. Brain extracellular matrix. **Glycobiology**, v.6, n.5, Jul, p.489-92. 1996.

SADOWSKI, M., TANG, C. Y., AGUINALDO, J. G., CARP, R., MEEKER, H. C. e WISNIEWSKI, T. In vivo micro magnetic resonance imaging signal changes in scrapie infected mice. **Neurosci Lett**, v.345, n.1, Jul 10, p.1-4. 2003.

SANTOS-FILHO, C., GHAMMACHI, B., GUERREIRO-DINIZ, C., BORNER, R., RENDEIRO, F., SOUSA, A., LINS, N., PASSOS, A., TRÉVIA, N., VASCONCELOS, E., DNIZ, D., BENTO-TORRES, J. e PICANÇO-DINIZ, C. Conservative morphological design of axon terminals of the entorhinal-to-dentate gyrus ipsilateral projections and of intrinsic projections of the medial entorhinal cortex in albino Swiss mice. **Brain Research**. 2009.

SASAKI, A., HIRATO, J. e NAKAZATO, Y. Immunohistochemical study of microglia in the Creutzfeldt-Jacob diseased brains. . **Acta Neuropathol** v.86, p.337-344. 1993.

SCHMITZ, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. **Anat Embryol (Berl)**, v.198, n.5, Nov, p.371-97. 1998.

SCHMITZ, C. e HOF, P. R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **J Chem Neuroanat**, v.20, n.1, Oct, p.93-114. 2000.

SCHMITZ, C. e HOF, P. R. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v.130, n.4, p.813-31. 2005.

SCHMITZ, C., RHODES, M. E., BLUDAU, M., KAPLAN, S., ONG, P., UEFFING, I., VEHOFF, J., KORR, H. e FRYE, C. A. Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. **Mol Psychiatry**, v.7, n.7, p.810-3. 2002.

SEVERI, S., GUIDI, S., CIANI, E. e BARTESAGHI, R. Sex differences in the stereological parameters of the hippocampal dentate gyrus of the guinea-pig before puberty. **Neuroscience**, v.132, n.2, p.375-87. 2005.

SHASHOUA, V., HESSE, G. e MOORE, B. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S100 protein. **J Neurochem**, v.42, p.1536-41. 1984.

SHENG JG, MRAK RE e WST, G. S100 protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. **J Neurosci Res** v.39, p.398-404. 1994.

SHETTY, A. K. e TURNER, D. A. Aging impairs axonal sprouting response of dentate granule cells following target loss and partial deafferentation. **J Comp Neurol**, v.414, n.2, Nov 15, p.238-54. 1999.

SHU, S., JU, G. e FAN, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett** v.85, p.169-171. 1988.

SLOMIANKA, L. e WEST, M. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience** v.136, p.757-767. 2005.

SMITH, M., KUTTY, R., RICHEY, P., YAN, S., STERN, D., CHADER, G., WIGGERT, B., PETERSEN, R. e PERRY, G. Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. **Am J Pathol** v.145, p.42-47. 1994.

SMITH, M., RICHEY HARRIS, P., SAYRE, L., BECKMAN, J. e PERRY, G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v.17, p.2653-2657. 1997.

SPENCER, M., KNIGHT, R. e WILL, R. First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. **British Medical Journal**, v.324, p.1479-1482. 2002.

SQUIRE, L. R., STARK, C. E. e CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annu Rev Neurosci**, v.27, p.279-306. 2004.

STREIT, W. J. Microglial response to brain injury: a brief synopsis. **Toxicol Pathol**, v.28, n.1, Jan-Feb, p.28-30. 2000.

STURROCK, R. R. Stability of neuron and glial number in the abducens nerve nucleus of the ageing mouse brain. **J Anat**, v.166, Oct, p.97-101. 1989.

SWANSON, L. W. **The Hippocampus and the Concept of Limbic System**. London: Academic Press. 1983. 3-19 p. (Neurobiology of the Hippocampus)

TAKAHASHI, T., ZHU, Y., HATA, T., SHIMIZU-OKABE, C., SUZUKI, K. e NAKAHARA, D. Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats. **Neuroscience**, Nov 7. 2008.

TAPP, P. D., SIWAK, C. T., GAO, F. Q., CHIOU, J. Y., BLACK, S. E., HEAD, E., MUGGENBURG, B. A., COTMAN, C. W., MILGRAM, N. W. e SU, M. Y. Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. **J Neurosci**, v.24, n.38, Sep 22, p.8205-13. 2004.

THACKRAY, A., KNIGHT, R., HASWELL, S., BUJDOSO, R. e BROWN, D. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. **Biochem J**, v.362, p.253-8. 2002.

TREVIA, N. **Correlação entre as Alterações Comportamentais e a Neuropatologia da Doença Prion Agravada por Infecção por Arbovírus**. Trabalho de Conclusão do Curso Médico. Belém: Universidade Federal do Pará: 59 p. 2008.

TURNER, D. A., BUHL, E. H., HAILER, N. P. e NITSCH, R. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog Neurobiol**, v.55, n.6, Aug, p.537-62. 1998.

UNTERBERGER, U., VOIGTLANDER, T. e BUDKA, H. Pathogenesis of prion diseases. **Acta Neuropathol**, v.109, n.1, Jan, p.32-48. 2005.

VALZELLI, L., KOZAK, W., ZANOTTI, A. e TOFFANO, G. Activity of phosphatidylserine on memory retrieval and on exploration in mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.9, n.10, Oct, p.657-60. 1987.

VAN GROEN, T., KADISH, I. e M, W. J. Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v. 57 n.3/4, p.553–556. 2002.

VAN GROEN, T., MIETTINEN, P. e KADISH, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v.13, n.1, p.133-49. 2003.

VAN HAEFTEN, T., JORRITSMA-BYHAM, B. e WITTER, M. P. Quantitative morphological analysis of subicular terminals in the rat entorhinal cortex. **Hippocampus**, v.5, n.5, p.452-9. 1995.

VAN HAEFTEN, T., WOUTERLOOD, F. G., JORRITSMA-BYHAM, B. e WITTER, M. P. GABAergic presubicular projections to the medial entorhinal cortex of the rat. **J Neurosci**, v.17, n.2, Jan 15, p.862-74. 1997.

VAN RHEEDE, T., SMOLENAARS, M. M., MADSEN, O. e DE JONG, W. W. Molecular evolution of the mammalian prion protein. **Mol Biol Evol**, v.20, n.1, Jan, p.111-21. 2003.

VEENMAN, C. L., REINER, A. e HONIG, M. G. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. **J Neurosci Methods**, v.41, n.3, Mar, p.239-54. 1992.

VIDAL, C., MERIC, P., PROVOST, F., HERZOG, C., LASMEZAS, C., GILLET, B., BELOEIL, J. C. e DORMONT, D. Preclinical metabolic changes in mouse prion diseases detected by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Neuroreport**, v.17, n.1, Jan 23, p.89-93. 2006.

VIGGIANO, D. The two faces of perineuronal nets. **Neuroreport**, v.11, n.10, Jul 14, p.2087-90. 2000.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell Tissue Res**, v.329, n.3, Sep, p.409-20. 2007.

WANG, Z., RAO, P. J., SHILLCUTT, S. D. e NEWMAN, W. H. Phenotypic diversity of smooth muscle cells isolated from human intracranial basilar artery. **Neurosci Lett**, v.351, n.1, Nov 6, p.1-4. 2003.

WEIBEL, E. R. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. **J Microsc**, v.155, n.Pt 3, Sep, p.393-403. 1989.

WEST, M., KAWAS, C., STEWART, W., RUDOW, G. e TRONCOSO, J. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v.25, n.9, p.1205-1212. 2004.

WEST, M. J. New stereological methods for counting neurons. **Neurobiol Aging**, v.14, n.4, Jul-Aug, p.275-85. 1993.

WEST, M. J. Design-based stereological methods for counting neurons. **Prog Brain Res**, v.135, p.43-51. 2002.

WEST, M. J., SLOMIANKA, L. e GUNDERSEN, H. J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec**, v.231, n.4, Dec, p.482-97. 1991.

WHITNEY, N. P., EIDEM, T. M., PENG, H., HUANG, Y. e ZHENG, J. C. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. **J Neurochem**, Jan 19. 2009.

WICK, G., JANSEN DWR, P., BERGER, P., BLASKO, I. e GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Diseases of Aging. **Vaccine**, v.18, n.16, Feb 25, p.1567-83. 2000.

WIERZBA-BOBROWICZ, T., GWIAZDA, E., KOSNO-KRUSZEWSKA, E., LEWANDOWSKA, E., LECHOWICZ, W., BERTRAND, E., SZPAK, G. e SCHIMIDT-SIDOR, B. Morphological analysis of active microglia - rod and ramified microglia in human brain affected by some neurological diseases (SSPE, Alzheimer's disease and Wilson's disease). v.40, n.3, p.125-131. 2002.

WILLIAMS. **Mouse Brain Atlas: C57bl/6j Horizontal**. Disponível em: <http://www.mbl.orgc> 1999.

WILLIAMS, A., LUCASSEN, P. J., RITCHIE, D. e BRUCE, M. PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. **Exp. Neurol.**, v.144, p.433-438. 1997.

WILLIAMS, A. E., LAWSON, L. J. e PERRY, V. H. Characterization of the microglial response in murine scrapie. **Neuropathol Appl Neurobiol**, p.47-55. 1994.

WIRENFELDT, M., DALMAU, I. e FINSEN, B. Estimation of absolute microglial cell numbers in mouse fascia dentata using unbiased and efficient stereological cell counting principles. **Glia**, v.44, n.2, Nov, p.129-39. 2003.

WITGEN, B. M., LIFSHITZ, J. e GRADY, M. S. Inbred mouse strains as a tool to analyze hippocampal neuronal loss after brain injury: a stereological study. **J Neurotrauma**, v.23, n.9, Sep, p.1320-9. 2006.

WITTER, M. P. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. **Prog Brain Res**, v.163, p.43-61. 2007.

WITTER, M. P. e MOSER, E. I. Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex. **Trends Neurosci**, v.29, n.12, Dec, p.671-8. 2006.

WONG, B., BROWN, D., PAN, T., WHITEMAN, M., LIU, T., BU, X., LI, R., GAMBETTI, P., OLESIK, J., RUBINSTEIN, R., , e SY, M. Oxidative impairment in scrapie-infected mice is associated with brain metal perturbations and altered anti-oxidation activities. **J Neurochem**, v.79, p.689-698. 2001.

XIANG, Z., HAROUTUNIAN, V., HO, L., PUROHIT, D. e PASINETTI, G. Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. **Dis. Markers**, v.22, p.95-102. 2006.

YAMADA, K. e NABESHIMA, T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. **Pharmacology & Therapeutics 88 (2000)** v.88, p.93-113. 2000.

YAMAGUCHI, Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. **Cell Mol Life Sci**, v.57, n.2, Feb, p.276-89. 2000.

YANKNER, B. Amyloid and Alzheimer's disease-cause or effect? . **Neurobiol. Aging** v.10, p.470-471. 1989.

YOSHIDA, T., TANAKA, M., SUZUKI, Y., SOHMIYA, M. e OKAMOTO, K. Antioxidant properties of cabergoline: inhibition of brain auto-oxidation and superoxide anion production of microglial cells in rats. **Neurosci Lett**, v.330, n.1, Sep 13, p.1-4. 2002.

ZAREMBA, S., GUIMARAES, A., KALB, R. G. e HOCKFIELD, S. Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. **Neuron**, v.2, n.3, Mar, p.1207-19. 1989.

ZHAO, N., ZHONG, C., WANG, Y., ZHAO, Y., GONG, N., ZHOU, G., XU, T. e HONG, Z. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. **Neurobiol Dis**, v.29, n.2, Feb, p.176-85. 2008.

ZILKA, N., FERENCIK, M. e HULIN, I. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? **Bratisl Lek Listy**, v.107, n.9-10, p.374-83. 2006.

ANEXO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Doenças Neurodegenerativas Crônicas na Amazônia Brasileira: o impacto da infecção e da inatividade sobre o curso temporal das demências”**, protocolo nº **1701/05** sob a responsabilidade dos pesquisadores *Benedito Paulo Bezerra e Pedro Fernando da Costa Vasconcelos* e coordenação do *Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz*, obtendo APROVAÇÃO na reunião do dia 12/09/2005, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 12 de setembro de 2005


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFPA