



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
NÍVEL: DOUTORADO

**INFLUÊNCIAS DO ENVELHECIMENTO E DO AMBIENTE SOBRE A
PROGRESSÃO DA ENCEFALITE EXPERIMENTAL POR ARBOVÍRUS PIRY
EM MODELO MURINO: MUDANÇAS MORFOLÓGICAS MICROGLIAIS E
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS**

ALUNA: ALINE ANDRADE DE SOUSA
ORIENTADOR: CRISTOVAM WANDERLEY PICANÇO DINIZ

BELÉM
2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR



ALINE ANDRADE DE SOUSA

**INFLUÊNCIAS DO ENVELHECIMENTO E DO AMBIENTE SOBRE A
PROGRESSÃO DA ENCEFALITE EXPERIMENTAL POR ARBOVÍRUS PIRY
EM MODELO MURINO: MUDANÇAS MORFOLÓGICAS MICROGLIAIS E
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS**

Tese de doutoramento apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Neurociências da Universidade
Federal do Pará, como exigência
para obtenção do grau de doutor em
Neurociências. Orientador: Prof. Dr.
Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

BELÉM

2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR



ALINE ANDRADE DE SOUSA

**INFLUÊNCIAS DO ENVELHECIMENTO E DO AMBIENTE SOBRE A
PROGRESSÃO DA ENCEFALITE EXPERIMENTAL POR ARBOVÍRUS PIRY
EM MODELO MURINO: MUDANÇAS MORFOLÓGICAS MICROGLIAIS E
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS**

Tese de doutoramento apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal do Pará, como exigência para obtenção do grau de doutor em Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley

Aprovado em: 03/10/2014

Presidente:

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

Membros:

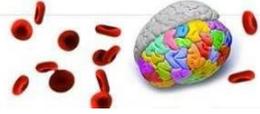
Prof^a. Dr^a. Márcia Consentino Kronka Sosthenes
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof^a.Dr^a. Roseane Borner de Oliveira
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior
Instituto Evandro Chagas (IEC)

BELÉM

2014

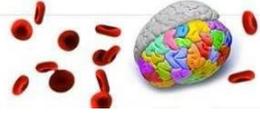


Dedico este trabalho científico:

À minha família que sempre esteve comigo nas horas mais difíceis, sustentando-me como verdadeiros pilares.

Ao meu querido orientador pelos momentos de ensinamentos e esclarecimentos que muito contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pela troca de experiências e convivência, sempre dispostos a me escutar e ajudar.



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indireta tiveram algum tipo de participação no desenvolvimento desse trabalho. Em especial ao Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz pela oportunidade e paciência, e aos meus amigos e colegas de laboratório (Taiany Nogueira, João Bento, Fabíola, Giovanne, Marcus Oliveira, Camila Lima, entre outros) que sempre estiveram dispostos a me ajudar na execução deste projeto.

A todos os meus familiares, mas em especial ao meu pai Jaime, minha mãe Arlete, minha irmã Arlene, meus sobrinhos Edu e Emily, meu companheiro Mauro Lima e minha adorada filha Eva Beatriz pela compreensão de tantos momentos ausentes e por terem acreditado sempre na minha capacidade, sendo este o apoio foi fundamental para realização deste trabalho.

OBRIGADA!!!



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AE/EE	Ambiente Enriquecido
AEPy	Ambiente Enriquecido com Piry
AP/IE	Ambiente Padrão
APPy	Ambiente Padrão com Piry
B	Burrowing
BL	Baseline
C	Centro
CA	Campo Aberto
CA1	Corno de Amon 1
CA2	Corno de Amon 2
CA3	Corno de Amon 3
CA4	Corno de Amon 4
CE	Córtex Entorrinal
Ct	Controle
d ₀	Diâmetro dos Ramos Primários
d ₁ , d ₂	Diâmetro dos Ramos Secundários
DO	Discriminação Olfatória
DPI	Dias pós inoculação
GD	Giro Denteado
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
IBA-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IC	Intracerebral
IEC	Instituto Evandro Chagas
IN	Intranasal
IFN	Interferon
IP	Intraperitoneal
L	Comprimento do Segmento
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTP	Potencialização de Longo Prazo
NIH	Principles of Laboratory Animal Care
NK	Natural killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PS	Palha Suja
P	Periferia
PBS	Tampão Fosfato Salina
PL	Palha Limpa
PVC	Polyvinyl Chloride
R1	Raio do Início do Segmento
R2	Raio do Fim do Segmento
SGZ	Zona Subventricular do Giro Denteado
SNC	Sistema Nervoso Central
Tfh	Células T-foliculares
TLR	Receptores toll-like



TNF- α Fator de Necrose Tumoral α
VDENVírus da dengue
VSVEstomatite Vesicular
XMenor Distância entre as extremidades dos ramos em questão
 $\alpha 1, \alpha 2$ Ângulo Planar entre os ramos 1 e 2



SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Doenças Infecciosas e Deslocamento Demográfico.....	12
1.2 Resposta Imune à infecções Virais durante o Envelhecimento.....	13
1.3 Encefalites causadas por Arbovírus: o Arbovírus Piry como um modelo para o estudo das encefalites virais não letais.....	14
1.4 Ativação microglial, Imunidade e Neuroinflamação	18
1.5 Exercício físico, Ambiente Enriquecido, Envelhecimento e Resposta imune.....	22
1.6 Organização Funcional da Formação Hipocampal.....	23
Objetivos.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Animais.....	27
2.2 Alojamento.....	27
2.3 Desenho Experimental.....	28
2.3.1 Animais adultos	28
2.3.2 Animais senis	29
2.4 Inoculação Viral.....	29
2.5 Testes Comportamentais.....	30
2.5.1 Campo Aberto (CA).....	31
2.5.2 Burrowing (B).....	32
2.5.3 Discriminação Olfatória (DO).....	33
2.6 Perfusão e Craniotomia.....	33
2.7 Estudos Imunohistoquímicos.....	34
• Vírus Piry.....	34
• IBA-1 (micróglia).....	35
• Contracoloração.....	36
2.8 Morfometria baseada na Reconstrução Tri-dimensional.....	37
2.9 Análise de Dados Comportamentais.....	43
2.10 Análise Estatística.....	44



3. RESULTADOS	45
3.1 Percentual de Mortalidade após Inoculação Viral	45
3.2 Teste de remoção e estocagem de comida ou Burrowing ...	45
3.3 Campo Aberto (CA)	47
3.4 Discriminação Olfatória (DO)	49
3.5 Diferenças Qualitativas no Fenótipo das micróglias em CA3 Dorsal	50
3.6 Análise Morfométrica das micróglias imunomarcadas com IBA-1	53
3.7 Micróglias médias de cada grupo experimental: Reconstrução tridimensional	59
3.8 Análise de Conglomerados e Análise Discriminante	59
4. DISCUSSÃO	64
5. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO I (Parecer do Comitê de Ética)	87
ANEXO II (Artigo submetido)	88



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Eletromicrografia por contraste negativo do vírus Piry, proveniente de amostra de sobrenadante de cultivo primário de células Vero com 24h pós-inoculação.....	16
Figura 2 - Fotomicrografias dos estágios de ativação da micróglia. Estágio inicial (A); estágio intermediário (B) e estágio avançado (C).....	20
Figura 3 - Perfis de expressão de marcadores inflamatórios em micróglia adulta e senis.....	21
Figura 4 - Desenho esquemático do hipocampo.....	24
Figura 5 - Divisão hipocampal em hipocampo dorsal e hipocampo ventral.....	25
Figura 6 - Gaiolas de alojamento dos animais ao longo do experimento.....	28
Figura 7- Fotomicrografia da partícula viral.....	30
Figura 8 - Caixa utilizada para a realização do teste do Campo Aberto (CA).....	31
Figura 9 - Tubo PVC que simula a toca do camundongo no teste do burrowing.....	32
Figura 10 - Aparato utilizado para realizar o teste de discriminação olfatória.....	33
Figura 11 - Área de interesse (CA3) e demonstração da análise sistemática e aleatória.....	38
Figura 12 – Medidas do soma e dos ramos.....	39
Figura 13 – Conceito de tortuosidade de um ramo microglial.....	41



Figura 14 - Figuras com variações em suas formas comparadas por seu fator de forma (“form factor”) e circularidade (“roundness”).....	41
Figura 15 – Conceito de ângulo planar.....	42
Figura 16 – Ilustração demonstrando os padrões de ramificação das micróglia, através da análise da dimensão fractal.....	42
Figura 17 – Tela com o menu do <i>Software Any Maze Stoelting®</i> utilizado na análise dos vídeos dos testes comportamentais.....	43
Figura 18 - Gráfico representativo do teste de remoção e estocagem de comida ou Burrowing em animais adultos.....	46
Figura 19 - Gráfico representativo do teste de remoção e estocagem de comida ou Burrowing em animais senis.....	46
Figura 20 - Gráficos do teste de Campo Aberto em animais adultos.....	47
Figura 21 - Gráficos do teste de Campo Aberto em animais senis.....	48
Figura 22 - Gráficos do teste de discriminação olfatória dos animais adultos.....	49
Figura 23 - Gráficos do teste de discriminação olfatória (DO) em animais senis.....	50
Figura 24 - Fotomicrografias das micróglia em CA3 nos grupos de AE adulto e senil.....	51
Figura 25. Fotomicrografias das micróglia em CA3 nos grupos de AP adulto e senil.....	52

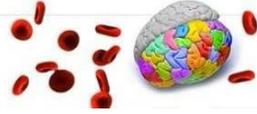


Figura 26. Fotomicrografias das micróglia dos animais controle senis aos 7 e 10DPI.....	53
Figura 27: Gráficos representativos dos parâmetros morfométricos relacionados aos ramos e ao soma das micróglia reconstruídas tridimensionalmente.....	55
Figura 28: Gráficos representativos dos parâmetros morfométricos relacionados aos ramos e ao soma das micróglia reconstruídas tridimensionalmente (cont.)	56
Figura 29 - Células médias dos grupos experimentais de Ambiente Enriquecido reconstruídas tridimensionalmente.....	60
Figura 30 - Células médias dos grupos experimentais de Ambiente Padrão reconstruídas tridimensionalmente.....	61
Figura 31. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia (A) e Análise discriminante (B) para ilustrar a distinção entre os grupos de micróglia de CA3.....	62



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho experimental do grupo dos animais adultos (jovens).....	28
Tabela 2. Desenho experimental do grupo dos animais senis.....	29
Tabela 3. Protocolo utilizado para a imunomarcação para o vírus Piry.....	34
Tabela 4. Protocolo utilizado para a imunomarcação para as micróglia ativa utilizando o anticorpo anti-IBA-1.....	35
Tabela 5. Protocolo utilizado para contra-coloração das lâminas.....	36
Tabela 6. Parâmetros morfológicos medidos nas micróglia reconstruídas: 10 relacionados ao soma e 11 relacionados aos ramos.....	39
Tabela 7. Parâmetros morfológicos microgliais dos animais adultos (A) e senis (S) infectados (Py).....	57
Tabela 8. Parâmetros utilizados para a análise de conglomerados, mostrando os quatro critérios que mais contribuíram para a formação dos grupos.....	63



RESUMO

O enriquecimento ambiental e os efeitos do envelhecimento sobre as alterações morfológicas das micróglias e no comportamento foram investigados em modelo murino de encefalite sub-letal por arbovírus. Para medir possíveis influências da idade e do ambiente sobre a progressão da encefalite, camundongos suíços albinos fêmeas de 2 meses de idade foram mantidos em Ambiente Padrão (AP) ou em Ambiente Enriquecido (AE), durante: 6 meses (Adulto - A) e 16 meses (Senil -S). Após os testes comportamentais, os camundongos A e S foram inoculados intranasalmente com igual volume de homogenado de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Piry (Py) ou homogenado de cérebro de camundongo normal. Oito dias após a inoculação (8DPI), quando os primeiros testes comportamentais revelaram as alterações relacionadas à doença, os cérebros foram seccionados e imunomarcados seletivamente para IBA-1 e antígenos virais. Aos 20 ou 40DPI, os animais restantes foram testados comportamentalmente e processados para os mesmos marcadores e nenhum sinal neuropatológico foi detectado. Em camundongos adultos infectados o ambiente padrão (APPyA), a atividade de burrowing diminuiu e se recuperou rapidamente (8-10DPI), a atividade de campo aberto (20-40DPI), mas manteve-se inalterado em animais da mesma idade e de ambiente enriquecido (AEPyA). Em contraste animais senis tanto de ambiente enriquecido (AEPyS) quanto de ambiente empobrecido (APPyS) reduzem significativamente a atividade de burrowing em todas as janelas. A encefalite causada pelo vírus Piry, induziu perdas olfativas transitórias em animais APPyA e AEPyA, mas permanentes em APPyS e AEPyS. A imunomarcagem para os antígenos viral do Piry atingiram seu pico no parênquima do SNC aos 5 e 6DPI e desapareceu aos 8DPI. Todas as reconstruções tridimensionais das micróglias, foram realizadas aos 8DPI. Mudanças Microgliais foram significativamente mais graves em camundongos adultos do que em camundongos senis, mas os animais AE parecem recuperar a morfologia microglia homeostática mais cedo do que os animais de AP. Os efeitos benéficos do AE foram menores em camundongos envelhecidos.

Palavras-chave: Encefalite por arbovírus Piry; Envelhecimento; Ambiente enriquecido; alterações comportamentais e microgliais.



ABSTRACT

Environmental enrichment and aging effects on behavioral and microglial morphological changes were investigated in a murine model of sub-lethal arbovirus encephalitis. To that end two-months-old female albino Swiss mice were raised in impoverished (IE) or in enriched environments (EE) during 6 (young - Y) or 16 (aged - A) months. After behavioral tests, Y and A mice were nasally instilled with an equal volume of *Piry virus* infected (Py) or normal brain homogenates. Eight days post-infection (DPI), when behavioral tests first revealed sickness changes, mice brains sections were immunoreacted with anti-IBA1 and anti-Piry virus antibodies. At 20 and 40 dpi, the remaining infected animals were behaviorally re-tested, and processed for the same markers. In infected young mice from impoverished environment (IYPy), burrowing activity decreased and recovered earlier (8–10 dpi) than open field activity (20–40 dpi) but remained unaltered in age-matched mice from enriched environment (EYPy). In contrast, aged infected mice, both from enriched (EAPy) and impoverished (IAPy) environments, reduced significantly burrowing activity at all-time windows. Piry virus encephalitis induced transitory olfactory losses in IYPy and EYPy but permanent in IAPy and EAPy. Piry virus antigens immunolabeling reached a peak in CNS parenchyma at 5 and 6dpi and disappeared at 8dpi. All microglia three-dimensional reconstructions were done at 8dpi. Microglial changes were significantly more severe in young adult than in aged mice but EY mice seem to recover to the microglial homeostatic morphology earlier than IY. EE beneficial effects were smaller in aged mice.

Key words: arbovirus encephalitis; aging; enriched environment; microglial and behavioral changes



1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Infecciosas e Deslocamento Demográfico

As doenças infecciosas são um grande problema nas agendas dos líderes mundiais e dos formuladores de políticas de saúde, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. As doenças infecciosas são a segunda principal causa de morte no mundo e a evolução contínua das doenças emergentes e re-emergentes, particularmente nos países em desenvolvimento, irá aumentar o impacto global das doenças infecciosas no século XXI; ver (FAUCI, 2001, p.675; MORENS; FAUCI, 2013, p.1003; MORENS *et al*, 2004, p.242) para revisão. Na Região Amazônica (foco deste trabalho) em que a gestão inadequada dos ecossistemas naturais vem ocorrendo há muitos anos, a emergência e reemergência de arboviroses tornou-se uma característica dominante das considerações regionais e nacionais de saúde pública (VASCONCELOS *et al.*, 2001, p.155). De fato, um total de 200 espécies diferentes de arbovírus em vertebrados, foram identificados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), entre mais de 10.000 cepas de vírus isoladas de seres humanos, insetos hematófagos e vertebrados silvestres e sentinelas. Até o momento muito pouca informação acerca desses patógenos está disponível além do método de isolamento e de sua capacidade de infectar animais de laboratório. Quatro dos arbovírus que infectam humanos (dengue, febre amarela, Oropouche e Mayaro) são as principais preocupações de saúde pública, uma vez que causaram epidemias e doença humana grave com impactos econômicos e sociais consideráveis (VASCONCELOS *et al.*, 2001, p.155). Atualmente são conhecidos 32 arbovírus potencialmente patogênicos para seres humanos, mas o envolvimento global desses patógenos na produção de doença humana permanece desconhecida.

Outra grande preocupação dos sistemas nacionais de saúde em todos os lugares no mundo moderno são as doenças do envelhecimento, devido ao aumento da expectativa de vida da maioria das populações mundiais. Projeções estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o percentual de idosos na população, devido à transição demográfica no Brasil, previu mudança de 7,3% em 1991 para 15% em 2025. De fato o novo século já começou com a população mais velha crescendo no Brasil a uma taxa duas vezes maior que o conjunto da população.



1.2. Resposta Imune à Infecções Virais durante o Envelhecimento.

O envelhecimento pode ser caracterizado para fins didáticos como um processo envolvendo três estágios: no primeiro estágio processos decorrentes das reações metabólicas produzem, inevitavelmente, substâncias tóxicas que estão associadas às reações químicas que mantêm a vida (um exemplo típico é o estresse oxidativo induzido por radicais livres); no segundo estágio estabelece-se algum dano decorrente do fato de que parte dessas substâncias não pode ser removida, acumulando-se ao longo do tempo; no terceiro estágio esse dano acumulado ocasiona mudanças patológicas através de alterações diretas (que interferem com o metabolismo) ou de ações indiretas decorrentes da inadaptação dos processos de reparo que acabam por permitir danos colaterais (ZEALLEY; DE GRAY, 2012, p.629).

No que concerne ao sistema imune o conceito de imunossenescência refere-se à mudanças na resposta imune inata e adaptativa relacionadas à idade, disparadas por patógenos externos ou antígenos autólogos, que comprometem tanto as respostas celulares quanto humorais (CASTELO-BRANCO; SOVERAL, 2013, p.735). A resposta adaptativa parece entretanto mais comprometida do que a resposta imune inata. Um exemplo disso é o que acontece com as células T de memória. Células T de memória em condições homeostáticas desenvolvem uma robusta linha de defesa contra a reinfecção por patógenos previamente encontrados ou contra a infecção por patógenos semelhantes (não necessariamente idênticos).

Isso só é possível por conta do fato de que múltiplos clones de células com afinidades ligeiramente diferentes são produzidos dando origem a células T com um certo grau de diversidade (WENSVEEN *et al.*, 2013, p.1180). Na infecção secundária por VDENV (Vírus da Dengue) sorotipo 2 por exemplo encontrou-se 30 diferentes epítopos em células T, sendo 9 deles em células CD4+, e 21 outros em células CD8+. Enquanto as células CD8+ tinham como alvo preferencial proteínas não estruturais (NS3 E NS5) os linfócitos CD4+ reconheciam componentes virais do envelope, do capsídeo e a proteína não estruturais NS1. Esses alvos do linfócito T CD4+ eram compartilhados com linfócitos B. Consistente com isso, uma grande proporção dos linfócitos CD4+ exibiam características de linfócitos auxiliares (expressando quimosinas, e produzindo IL-12 ou IFN- γ) sugerindo sua interação com linfócitos B *in vivo*.



O envelhecimento está associado à resposta imune alterada particularmente no que concerne a defeitos intrínsecos das células T CD8+ tornando-a limitada frente à infecções virais (BRIEN *et al.*, 2009, p.2735; JIANG; FISHER; MURASKO, 2013, p.579). De fato, esses autores demonstraram que embora a proliferação de linfócitos T frente à infecções virais não se distinga daquela de animais jovens, a porcentagem de linfócitos T secretando IFN- γ (Tipo II) nos camundongos velhos é significativamente menor do que nos animais jovens. Como se sabe, interferons do tipo I oferecem resistência à infecção viral e a regulação da resposta imune e o comprometimento de sua secreção durante o envelhecimento compromete a resposta à infecções virais (DE VEER *et al.*, 2001, p.912; SADLER; WILLIAMS; HARRY, 2008, p.559). De fato, o VDEN é suscetível ao tratamento com interferon in vivo e in vitro e em modelo murino, animais com déficits na via de sinalização por interferon tem maior mortalidade após infecções experimentais por VDEN do que camundongos selvagens (JOHNSON; ROHRIG, 1999, p.783).

Soma-se a isso o fato de que durante o envelhecimento há igualmente uma diminuição da resposta do centro germinativo dos folículos comprometendo a função de linfócitos foliculares auxiliares (T-follicular help cells - Tfh). Nessa região os linfócitos Tfh auxiliares CD4+ ajudam na sobrevivência e selecionam sinais para os linfócitos B do centro germinativo deixarem os folículos e se tornarem células B de memória, que uma vez circulantes provêm proteção contra reinfecções (LINTERMAN, 2014, p.72). O comprometimento da resposta imunológica humoral por essa e outras alterações moleculares que comprometem a função dos linfócitos B durante o envelhecimento contribui pelo menos em parte para o aumento da severidade e a frequência das reinfecções (BLOMBER; FRASCA, 2013, p.354).

1.3 Encefalites causadas por Arbovirus: o arbovirus Piry como um modelo para o estudo das encefalites virais não letais

As arboviroses são infecções causadas por vírus que são transmitidos por insetos e que pouco são estudadas (BERGE, 1975, p.75). As doenças virais emergentes do sistema nervoso central estão principalmente associadas ao grupo das RNA-viroses e muitas delas deixam sequelas neurológicas (OLIVAL *et al.*, 2005, p.441). Encefalites não letais subsequentes à infecção viral impactam o



comportamento e a resposta imune constituindo parte importante do conjunto de doenças neurológicas incapacitantes particularmente em países em desenvolvimento (JOHNSTON *et al.*, 2008, p.11).

Os rbdovírus são parte de um grande grupo de anti-sense RNA-vírus (Ordem: Monomegavirales) que causam muitas viroses relevantes do ponto de vista clínico, incluindo influenza, sarampo, Ebola e estomatite vesicular (KUZMIN *et al.*, 2009, p.541).

A família Rhabdoviridae é constituída pelos vírus mais amplamente distribuídos na natureza (FU, 2005, p.292) apresentando algumas características biológicas em comum, tais como: infectividade em camundongos albinos suíços recém-nascidos (DIAS, 1986) e tropismo pelo sistema nervoso (CRUZ, 1981, p.194; ARAÚJO *et al.*, 1986). A família Rhabdoviridae divide-se em onze gêneros, dos quais fazem parte o gênero Vesiculovírus, que inclui o sorogrupo da estomatite vesicular (VSV) e o vírus Piry; e o gênero Lissavírus que inclui o vírus da raiva (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA, 1994, p.214).

O vírus da estomatite vesicular tem sido usado como protótipo para o estudo das rbdoviroses, tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* enfocando as respostas inata e adaptativa do hospedeiro à infecção (REISS *et al.*, 1998, p.751; VAN DEN POL *et al.*, 2009, p.456).

A espécie identificada e isolada de variedades conhecidas empregada no presente trabalho é o Vesiculovírus Piry, por produzir, no camundongo adulto uma inflamação cerebral crônica e não letal. O outro motivo para escolha dessa espécie é o fato de produzir doença humana. A doença humana provocada pelo vírus Piry é caracterizada por um início rápido, com febre alta, dor de cabeça, calafrio, fotofobia, mialgia, tontura e fraqueza (DE ARAÚJO *et al.*, 1978, p.102).

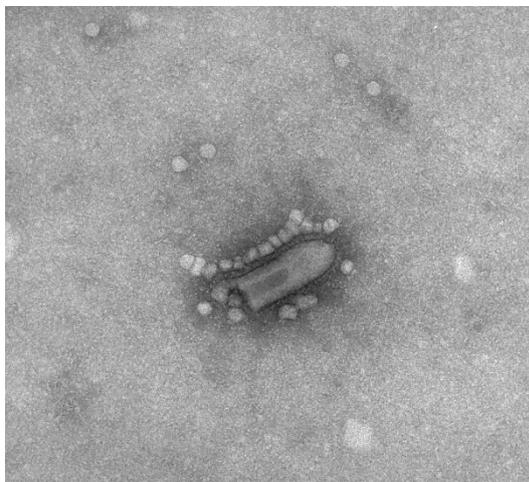
Não há muitas publicações a respeito do vírus Piry, porém sabe-se que foi isolado no ano de 1960, em Belém do Pará, Brasil, a partir de material proveniente das vísceras de um marsupial *Philander opossum*. O vírus Piry tem ecologia ainda pouco conhecida, porém suspeita-se que mantenha um ciclo hospedeiro silvestre- vetor, embora os mesmos ainda não tenham sido determinados (PINHEIRO, 1981, p.187; FIGUEIREDO *et al.*, 1986, p.204). Na Amazônia, a prevalência de infecções pelo vírus Piry detectada através de sorologia na população humana tem variado de



4% a 17% em diferentes populações (PINHEIRO *et al.*, 1974, p.292; PINHEIRO, 1981, p.187).

O arbovírus Piry é classificado como pertencente à família *Rhabdoviridae* com bases nas suas propriedades físico-químicas. A partícula viral tem o formato em “bala de revólver” (Figura 1) medindo 155nm x 62nm demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão (BERGOLD; MUNIZ, 1970, p.152). O vírus pertence ao grupo antigênico dos vesiculovírus (BERAN, 1994, p.220).

Figura 1 - Eletromicrografia por contraste negativo do vírus Piry. Amostra proveniente de sobrenadante de cultivo primário de células Vero com 24h pós-inoculação.



Fonte: Foto cedida pelo Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas – Pará

O vírus Piry em camundongos neonatos atinge preferencialmente o sistema nervoso central produzindo lesões diferentes (CARD *et al.*, 1999, p.438; EVERETT; MCFADDEN, 2001, p.1; FAZAKERLEY, 2004, p.179), induzindo necrose e apoptose, sendo que a primeira é mais evidente no córtex cerebral e a segunda, no hipocampo, levando a morte cerca de 18 h após a inoculação (GOMES-LEAL *et al.*, 2006, p.126), o que pode ser uma consequência da resposta inflamatória induzida pela virose (ROULSTON *et al.*, 1999, p.577; JULKUNEM *et al.*, 2000, p.32; REMPEL *et al.*, 2004,p.381).

De um modo geral, a patogênese da invasão viral envolve muitos passos distintos, incluindo replicação no sítio primário da infecção, entrada e propagação dentro do SNC, replicação no tecido neural seguido de resposta imune inata e ou



adquirida e danos ao tecido (CROTTY *et al.*, 2002, p.1707; FAZAKERLEY, 2004, p.179; REMPEL *et al.*, 2004, p.381).

Os achados patológicos observados no SNC (Sistema Nervoso Central) apresentam poucas variações no tipo de injúria, diferindo mais na intensidade. De um modo geral a intensidade dessas lesões depende do tipo de vírus e tempo de infecção (DIAS, 1982, p.171). São caracterizadas por alterações degenerativas e necróticas celulares, de extensão e localização variadas, acompanhadas por um componente exudativo representado por infiltração mononuclear perivascular e meníngeo, seguido de morte após curta sobrevida, sobretudo em camundongos jovens (DE PAOLA *et al.*, 1963, p.132). Estudos experimentais mostraram que as lesões causadas por arbovírus acometem, principalmente, o SNC e, em segundo lugar, o fígado (DIAS, 1986, p.439). Nos camundongos recém-nascidos, os arbovírus apresentam peculiar capacidade de determinar encefalite enquanto que nos camundongos adultos há uma variação do comportamento, nem sempre se comprovando uma agressão ao SNC. Embora frequentemente determinem encefalites, algumas graves e fatais, estas estão na dependência da via de inoculação, do título do inóculo, ou ainda da cepa viral (PINHEIRO, 1981, p.187).

Os vírus podem alcançar o SNC através de diferentes rotas, incluindo o transporte axoplasmático e a via hematogênica durante a viremia, envolvendo neste último caso, a endocitose viral por células mononucleares, especialmente macrófagos perivasculares (LANE *et al.*, 1996, p.423; CARD *et al.*, 1997, p.49; CARD *et al.*, 1998, p.4434; CARD *et al.*, 1999, p.438). A disseminação hematogênica das arboviroses para o SNC é mais comum e pode resultar de alterações na barreira hematoencefálica (WHITLEY; GNANN, 2002, p.507).

A via olfatória é a mais frequente porta de entrada viral em sujeitos com tempo de sobrevida longo. Na cavidade nasal, os vírus afetam o epitélio respiratório, e de lá se propagam para outras regiões do SNC por três diferentes rotas neuronais incluindo, a via olfatória, a via trigeminal e o sistema nervoso autônomo, ou ainda através da vasculatura (BABIC *et al.*, 1994, p.616). A infecção por via olfatória é seguida por neuroinvasão das áreas temporal, parietal, frontal e outras áreas límbicas (LUNDH *et al.*, 1987, p.111; FORGER *et al.*, 1991, p.4950; HUNEYCUTT *et al.*, 1994, p.81).

Nesse sentido, muitos trabalhos têm se dedicado a entender a



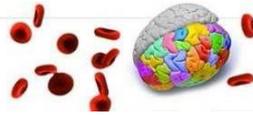
neuropatogênese de encefalites virais experimentais (CHARLES *et al.*, 1995, p.662; JACKSON *et al.*, 2001, p.614; FAZAKERLEY, 2004, p.179; REMPEL *et al.*, 2004, p.381; SAHA *et al.*, 2006, p.3285), contudo, poucos estudos investigaram a neuropatologia experimental dos arbovírus (HUNEYCUTT *et al.*, 1994, p. 81; GRIFFIN, 1995, p.121; PLAKHOV *et al.*, 1995, p.257; DOBLER, 1996, p.33; HUNSPERGER; ROEHRUG, 2006, p.129) e praticamente nenhum estudo abordou a neuropatologia das rbdoviroses na Amazônia (VASCONCELOS *et al.*, 2001, p.155; GOMES-LEAL *et al.*, 2006, p.126).

Por conta do fato de que se pretende investigar as alterações quantitativas da resposta inflamatória associadas à neuroinvasão é interessante rever o papel da micróglia nas infecções do SNC.

1.4 Ativação Microglial, Imunidade e Neuroinflamação.

Micróglia são células mielóides derivadas do saco vitelino embrionário que migram para o cérebro durante o início do desenvolvimento, e sustentam uma população residente através de sua proliferação (AJAMI *et al.*, 2007, p.1538; ALLIOT, *et al.*, 1999, p.145). Desempenham um papel relevante durante a função normal do sistema nervoso adulto e contribuem tanto para a imunidade inata quanto para a imunidade adaptativa desse sistema (ZIELASEK, HARTUNG, 1996, p.191). Embora possuam papéis distintos, as imunidades inata e adaptativa trabalham juntas para produzir uma resposta imune cada vez mais eficaz que facilite a recuperação em caso de uma lesão ou infecção (KOHMAN; RHODES, 2013, p.22). A combinação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa protegem e facilitam a recuperação após infecção ou lesão dentro do sistema nervoso periférico, já que a primeira serve como uma defesa inicial contra infecção, pois possui uma resposta rápida e não específica, sendo mediada primeiramente por células de origem mielóide (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) e a segunda, gera uma resposta imune mais duradoura e específica, pois a resposta imunológica é orientada principalmente por linfócitos do tipo T e B, os quais precisam de tempo para criar uma resposta antigênica específica (KOHMAN; RHODES, 2013, p.22).

Células microgliais são similares aos macrófagos periféricos, pois podem assumir vários fenótipos de ativação que lhes permitem examinar o ambiente,



remover os restos celulares ou patógenos, e auxiliar em processos regenerativos periféricos (KOHMAN; RHODES, 2013, p. 22). São descritas ainda como o “terceiro elemento” do SNC (CAJAL, 1913, p.255), essa definição se aplica a todas as células que apresentam morfologia diferente de um neurônio (“primeiro elemento”) e de astrócitos (“segundo elemento”) (GARDEN; MOLLER, 2006, p.127). Possuem funções específicas na defesa do SNC contra microorganismos, e na remoção de tecido degradado em doenças neurodegenerativas, em desordens inflamatórias auto-imunes no cérebro ou durante a morte celular programada durante o desenvolvimento normal (ZIELASEK; HARTUNG, 1996, p.191).

A ativação microglial tem um importante papel na patogênese de desordens inflamatórias experimentais, mas os mecanismos moleculares dessa ativação ainda não estão claros (ZIELASEK; HARTUNG, 1996, p.191). Trabalhos recentes sugerem que a regulação da função da micróglia pode ser uma possível estratégia terapêutica na prevenção de disfunções neurológicas em uma variedade de doenças do SNC, incluindo doenças crônicas (GARDEN; MOLLER, 2006, p.127) e neurodegenerativas, como esclerose múltipla e infecções bacterianas e virais do sistema nervoso (ZIELASEK; HARTUNG, 1996, p.191).

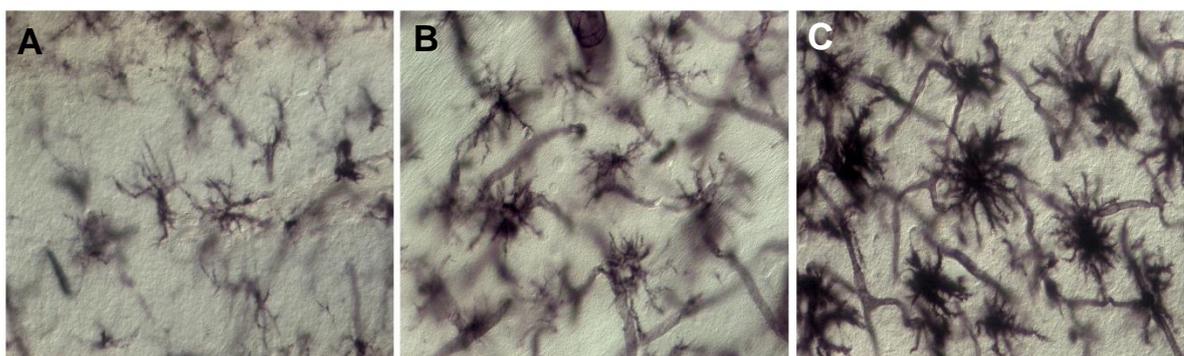
Mudanças na morfologia e na quantidade da micróglia têm sido documentadas ao longo deste século e são associadas à sua ativação (ZIELASEK; HARTUNG, 1996, p.191). O fenótipo funcional da micróglia é comprovadamente dependente das alterações do microambiente, no qual esta célula se encontra, levando-a a adaptar-se, para que possa lidar melhor com a alteração na homeostase do sistema (EKDAHL *et al.*, 2009, p.1021).

Micróglias são ativadas por vários estímulos ambientais causados por uma doença ou dano cerebral. A micróglia ativada exhibe transformação morfológica, proliferação, migração, fagocitose e produção de moléculas bioativas (IMAI; KOHSAKA, 2002, p.164). No cérebro ferido ou doente, a micróglia residente, que normalmente têm corpos pequenos com processos finamente ramificados, são ativadas para proliferar e migrar para o local do dano, e, em seguida, são drasticamente transformados, expandindo-se e assumindo formas ameboides, com a capacidade de limpar patógenos invasores ou os restos de tecido (NAKAJUMA; KOHSAKA, 1993, p. 187; KREUTZBERG, 1996, p.312).

Essas alterações morfológicas no padrão da célula microglial podem ter efeitos benéficos ou nocivos na neurogênese da vida adulta, dependendo do seu estado de ativação. A micróglia que expressa um fenótipo pró-inflamatório geralmente prejudica a neurogênese enquanto que a micróglia que expressa um fenótipo “neuroprotetor” pode facilitar a sobrevivência de uma nova célula nervosa (KOHMAN; RHODES, 2013, p.22).

A indução destes fenótipos variados ocorre em resposta a sinais a partir do microambiente circundante. Quando ocorre uma infecção ou lesão, a micróglia pode adquirir um fenótipo inflamatória reativo, também conhecido como o fenótipo clássico. O fenótipo inflamatório clássico é caracterizado pelo aumento da proliferação das micróglia, alterações morfológicas (por exemplo, aumento do corpo celular e retração dos processos) (Figura 2), e a liberação de várias moléculas inflamatórias, incluindo citocinas, quimosinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (KETTENMANN *et al.*, 2011, p.461). Essas alterações morfológicas para uma aparência amebóide com processos citoplasmáticos encurtados e um corpo celular arredondado, são acompanhadas pelo aumento da expressão de genes envolvidos em respostas imunes (ZIELASEK; HARTUNG, 1996, p.191).

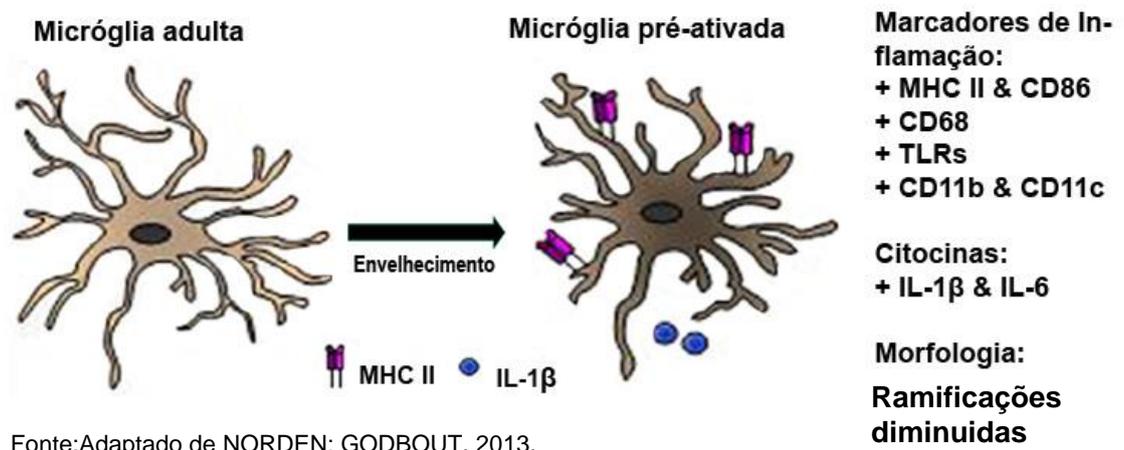
Figura 2 - Fotomicrografias dos estágios de ativação da micróglia. Estágio inicial (A); estágio intermediário (B) e estágio avançado (C).



Enquanto o envelhecimento, por si só, reduz a plasticidade neuronal, grandes diferenças na biologia microglial, entre animais jovens e senis, ocorrem quando o sistema imunológico é afetado e as micróglia são ativadas (NORDEN; GODBOUT, 2013, p.19), gerando uma neuroinflamação exagerada logo após a ativação das micróglia nos sistema nervoso central e periférico (GODBOUT; JOHNSON, 2006,

p.521; JURGENS; JOHNSON, 2012, p.40; CORONA et al., 2012, p.7). Esses estudos indicam que alterações imunes levam a um aumento exagerado na produção de citocinas pro-inflamatórias pelas micróglias (Figura 3) (NORDEN; GODBOUT, 2013, p.19).

Figura 3. Ilustração dos perfis de expressão de marcadores inflamatórios em micróglias adultas e senis.



Fonte: Adaptado de NORDEN; GODBOUT, 2013.

A ativação do sistema imune é um fator que também tem grande influência sobre o comportamento animal, diminuindo a ingestão de alimento e a atividade exploratória, alterando o comportamento sexual, e trazendo prejuízos à cognição (LARSSON *et al.*, 2002, p.193). Essas alterações são mediadas por citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas nos processos inflamatórios (infecções) e que também podem causar distúrbios emocionais, incluindo depressão e ansiedade (LARSSON *et al.*, 2002, p.193; SWIERGIEL; DUNN, 2007, p.651).

Uma série de modelos animais tem contribuído para a investigação das bases neurobiológicas do comportamento normal e patológico (BELZUNG, 2001, p.141; CLEMENT, 2002, p.57), incluindo aí o relacionamento entre as emoções e a desempenho comportamental (FILE, 2001, p.151; CLEMENT, 2002, p.57). Entretanto, a maioria dos trabalhos já realizados sobre a mudança comportamental induzida por ativação do sistema imune utilizando ratos e camundongos como sujeitos experimentais (DUNN *et al.*, 1992, p.63; LARSSON, 2002, p.193), não investigou o impacto do enriquecimento ambiental como fator de proteção contra possíveis



prejuízos provocados por infecções virais particularmente no que concerne a reconstrução tridimensional das células microgliais. Essa é a principal motivação do presente trabalho.

1.5 Exercício Físico, Ambiente Enriquecido, Envelhecimento e Resposta Imune.

O exercício pode promover mudanças no sistema imune de curto e longo prazo qualquer que seja a idade de quem o pratica e isso está relacionado à natureza, duração, intensidade e regularidade, assim como, a outros fatores que afetam suas interações com o sistema imune, por exemplo, o status nutricional e o estresse (WALSH *et al.*, 2011, p.6). Após exercício agudo ocorre alteração da resposta imune inata e isso inclui a mobilização de neutrófilos, de monócitos, de células dendríticas e de células NK (WOODS *et al.*, 1998, p.B730; PEAKE, 2002, p.49). A imunidade adquirida é igualmente afetada pelo exercício, havendo consenso de que o exercício agudo também provoca uma resposta de mobilização bifásica de linfócitos B e T dependente da intensidade e da duração do exercício (SHEK *et al.*, 1995, p.2479; WALSH *et al.*, 2011, p.6).

O ambiente enriquecido do ponto de vista experimental foi desenhado para mimetizar em modelos animais o estilo humano de vida ativa. Proporcionado por estímulos decorrentes de interações sociais, somatomotoras e visuo-espaciais, com um forte componente de exercício voluntário em rodinhas de correr, túneis, cordas, pontes e brinquedos que são renovados periodicamente. Tem sido demonstrado que animais que crescem nesse ambiente em comparação com aqueles que vivem sedentários em gaiolas padrão de laboratório, melhoram a fagocitose e quimiotaxia de macrófagos, a proliferação e quimiotaxia de linfócitos, aumentam a atividade de células NK, e modulam os níveis de TNF α e IL-2. Além disso, mostram decréscimo nos níveis do estresse oxidativo associado à inflamação reduzindo os níveis de glutathiona oxidada, xantina oxidase assim como da expressão de receptores toll-like 2 e 4 em células CD4+ e CD8+, e aumentando a atividade da glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase e catalase (ARRANZ *et al.* 2010, p.415) Esses efeitos são observados tanto em animais jovens quanto em idosos mas o impacto dessas mudanças induzidas pelo ambiente enriquecido é maior no sistema imune senescente (ARRANZ *et al.*, 2010, p.415).



Há agora um conjunto de evidências inequívocas de alterações importantes no sistema imune senescente. Dentre aquelas, destacam-se as alterações nas subpopulações de células T, no padrão de citocinas secretadas, na capacidade de replicação celular e na produção de anticorpos, criando um ambiente pro-inflamatório associado à diminuição da capacidade de resposta a antígenos novos (DE ARAÚJO *et al.*, 2013, p.879). De fato as células T senescentes se acumulam com a idade diminuindo o repertório de células T imunodisponíveis (“naive”) aumentando os riscos de infecção, enquanto que o exercício físico contribui para minimizar essa alteração (SPIELMANN *et al.*, 2011, p.1521).

Realmente indivíduos com estilo de vida sedentário mostram valores plasmáticos elevados para marcadores inflamatórios como a IL-6 e proteína C reativa, independente da presença de obesidade (FISCHER *et al.*, 2007, p.580). Esses achados são coerentes com o conceito de que o comprometimento funcional do sistema imune (e de outros sistemas) relacionado ao envelhecimento é decorrente pelo menos em parte do estresse oxidativo e da inflamação (DE LA FUENTE; MIQUEL, 2009, p.3003). Nesse sentido, indivíduos que se exercitam regularmente desenvolvem resposta anti-inflamatória, aumentando os níveis circulantes de receptores antagonistas de IL-1 e IL-10 (JEFFREY *et al.*, 2009, p. 381

Muitos trabalhos demonstram que a estimulação ambiental e o exercício físico voluntário, oferecido por este tipo de ambiente, provocam alterações na resposta imune, porém a memória e o comportamento também são afetados.

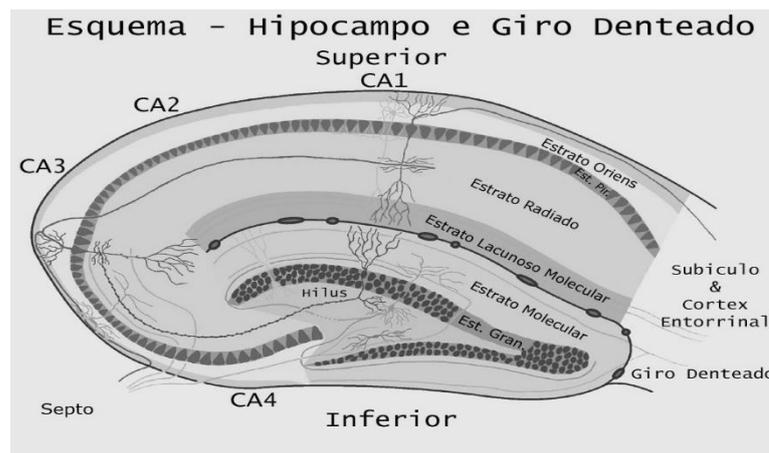
1.6 Organização Funcional da Formação Hipocampal.

O hipocampo é uma estrutura encefálica chave nos processos relacionados à formação da memória, ao processamento de informações e regulação do comportamento (NUNN; HODGES, 1994, p.1). Estudos mostram que o hipocampo é uma estrutura importante para as funções cognitivas, incluindo aprendizado e memória, sendo também uma área muito suscetível aos efeitos do enriquecimento ambiental (SCOVILLE, 1957, p.11). O hipocampo está altamente envolvido na codificação das memórias espacial e episódica (O’KEEFE, 1978, p.301; SQUIRE,

1992, p.195; EICHENBAUM, 2000, p.40), e com o condicionamento do medo contextual (NADEL, 1980, p.405; SUTHERLAND, 1989, p.331; FENDT; FANSELOW, 1999, p.743).

O hipocampo tem sido subdividido anatômica e funcionalmente. Quanto a sua anatomia o hipocampo é dividido em Corno de Amon (CA) 1, 2, 3 e 4 e região superior e inferior (BROWN *et al.*, 2003, p.467) ou região septal (dorsal) e região temporal (ventral) (BLACKSTAD, 1956, p.417; VAN GROEN *et al.*, 2003, p.133). CA1 e CA3 formam o hipocampo propriamente dito, e como CA2 é pequeno e indistinto em algumas espécies ele é frequentemente incluído em CA1 nas análises. O giro denteado (GD), o subiculum, o Córtex Entorrinal (CE) e CA4 são incluídos no termo “formação hipocampal”, e a área entre o GD e o stratum granulosum de CA3 é chamada de Polimórfica ou região hilar ou simplesmente hilus (BROWN *et al.*, 2003, p.467). 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 *et al.*, 2003, p.467), ver Figura 4.

Figura 4 - Desenho esquemático do hipocampo, demonstrando sua laminação e seu circuito tri-sináptico básico.



Fonte: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html

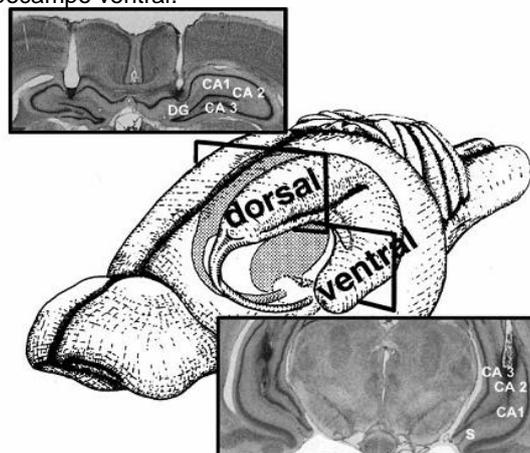
As conexões sinápticas entre as regiões do hipocampo podem ser simplificadas em um circuito trisináptico: fibras da via perfurante que se originam nas células das camadas II e III dos córtices entorrinal medial (não-olfatório) e lateral (olfatório) fazem

a primeira sinapse com as células granulares do giro denteado; essas células granulares enviam seus axônios (fibras musgosas) para a região de CA3 onde realizam a segunda sinapse com os neurônios piramidais dessa camada; finalmente os axônios dessas células piramidais (colaterais de Schaffer) formam a terceira sinapse com os neurônios piramidais de CA1 (Figura 4).

Funcionalmente o hipocampo é subdividido ao longo do seu eixo septotemporal, em região dorsal e região ventral (Figura 5), sendo que cada uma dessas regiões tem uma importância distinta no que diz respeito ao comportamento. O hipocampo dorsal tem um papel preferencial por certas formas de aprendizado e memória, mais precisamente o aprendizado espacial, enquanto que o hipocampo ventral tem uma maior importância nos processos comportamentais relacionados à ansiedade (SCOVILLE, 1957, p.11; ZHU *et al.*, 2006, p.10). A alta conectividade do hipocampo ventral com o hipotálamo e com a amígdala, tem um importante papel sobre o medo e a ansiedade, sugerindo que o hipocampo ventral pode exercer um controle sobre a expressão do medo condicionado, através da modulação da transmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal (LEVIN *et al.*, 2003, p.489; PEZZE *et al.*, 2003, p.371).

O hipocampo dorsal possui um papel predominante em muitos tipos de aprendizado (EPP *et al.*, 2007, p.273), sendo que suas sub-regiões (CA1 e CA3) são importantes no processamento das informações relacionadas à memória espacial e temporal (HOGE; KESNER, 2007, p.225).

Figura 5 - Divisão hipocampal em hipocampo dorsal e hipocampo ventral.



Fonte: Adaptado de Cheung, 2005.



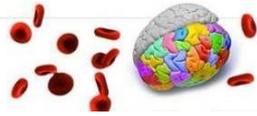
Objetivos

- **Geral**

Testar a hipótese de que as consequências das encefalites virais, em camundongos jovens e senis, podem ser minimizadas pela exposição desses animais, em ambiente enriquecido e em caso afirmativo investigar as bases celulares e moleculares que dão sustentação à hipótese.

- **Específicos**

- Implantar o arbovírus Piry como um modelo para o estudo das encefalites virais da família *Rhabdoviridae* em camundongos jovens e senis da variedade Suíça albina.
- Investigar as alterações comportamentais ao longo do curso da infecção viral pelo vírus Piry.
- Investigar as possíveis associações entre a morfologia microglial e as alterações comportamentais em animais jovens e senis infectados alojados em ambiente padrão ou em ambiente enriquecido.



2. MATERIAL E MÉTODOS

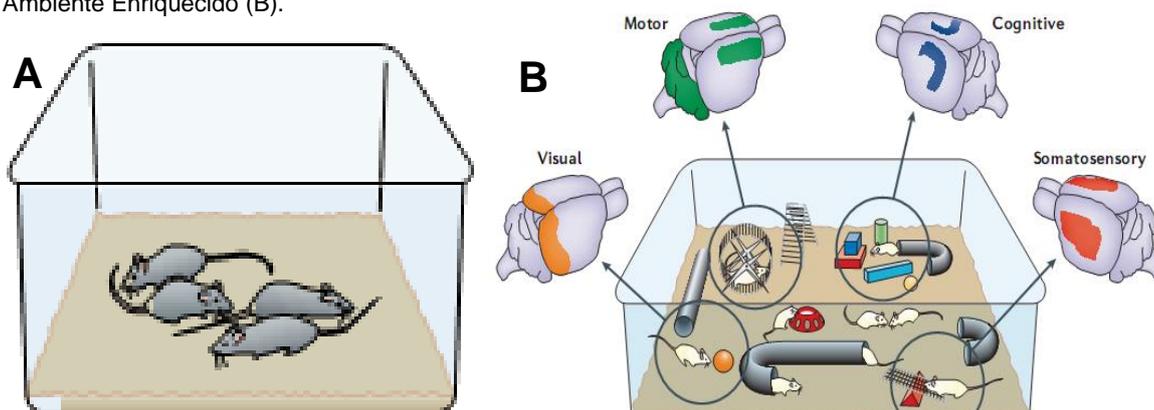
2.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados 174 camundongos suíços albinos fêmeas e adultos, com 2 meses de idade, originados da colônia do Biotério do Instituto Evandro Chagas-Pará e manipulados segundo os “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH). A utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE-UFPA) registrado com o número 222-14 (ANEXO I). Esses animais foram distribuídos, primeiramente, em dois grupos experimentais de acordo com a condição de alojamento: Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE). A partir de então eles foram separados em dois outros grupos de acordo com a idade: 6-10 meses (animais adultos – 59 animais) e 16-20 meses (animais senis – 115 animais). Os animais adultos pertencem aos trabalhos de SOUSA *et al.*, 2011 e REIS, R.R., 2012.

2.2 Alojamento

Os animais do grupo de AP, foram alojados em gaiolas plásticas com dimensões padrão (32x39x16.5 cm), sem qualquer tipo de enriquecimento para que houvesse o mínimo possível de exercício físico ou estímulo cognitivo (Figura 6A); enquanto o grupo AE foi colocado em gaiolas equipadas com diversos brinquedos, rodinhas, tubos de PVC, cordas, isopor, caixas de papelão e outros objetos com o objetivo de estimular a atividade motora e exploratória através de exercício físico voluntário (Figura 6B). Todos os animais foram colocados em uma sala com temperatura ambiente situada entre $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com um ciclo claro-escuro de 12 horas. Os materiais utilizados para enriquecer o ambiente foram substituídos e/ou trocados de lugar a cada sete dias. Os grupos AE e AP tiveram ração (NUVILAB CR1) e água *ad libitum*.

Figura 6 - Gaiolas de alojamento dos animais ao longo do experimento. Ambiente Padrão (A) e Ambiente Enriquecido (B).



Fonte: Adaptado de Hannan, 2006.

2.3 Desenho Experimental

2.3.1 Animais Adultos

Para compor os grupos experimentais de animais jovens foram utilizados 59 (cinquenta e nove) camundongos suíços albinos fêmeas a partir de dois meses de idade. Os animais foram então alojados em ambiente enriquecido (AE) ou em ambiente empobrecido (AP) entre 6 e 10 meses. Os animais do grupo AE (n=28) foram alojados em gaiolas de plástico (32x39x16,5cm), com cerca de dez camundongos por gaiola, equipada com rodinhas de correr, túneis e objetos variados de plástico, metal ou papelão, sendo estes trocados ou realocados uma vez por semana para estimular a atividade exploratória. Os animais do grupo AP (n=28) foram mantidos em gaiolas de plástico, também com cerca de dez animais por gaiola e com o mínimo estímulo ambiental possível (Tabela 1). Ambos os ambientes eram forrados com palha de arroz autoclavada, trocada uma vez por semana. Os animais tiveram acesso livre à água e comida e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h.

Tabela 1. Desenho experimental do grupo dos animais adultos (jovens)

2 meses de idade		6-10 meses de idade							
Chegada dos animais	Alojamento	Baseline	Inoculação viral	Testes Comportamentais 8DPI	Sacrifício dos animais	Testes Comportamentais 20DPI	Sacrifício dos animais	Testes Comportamentais 40DPI	Sacrifício dos animais
Animais Jovens	Ambiente Enriquecido	B CA DO	AEPY AECT	B CA DO	8DPI	B CA DO	20DPI	B CA DO	40DPI
	Ambiente Padrão	B CA DO	APPY APCT						



2.3.2 Animais Senis

O grupo de 115 animais idosos foi dividido em dois grupos experimentais (AE e AP) os quais foram mantidos em suas gaiolas experimentais durante um período de 16 a 20 meses. Ao fim desses períodos, os animais foram submetidos a testes comportamentais antes da inoculação (período pré-infecção). Logo após esses testes os animais foram sujeitos à infecção viral pelo arbovírus Piry. Cada um dos grupos teve animais infectados e animais controles (AEPY, AECT, APPY e APCT), divididos em três janelas temporais: 8, 20 e 40 dias pós-infecção (DPI). Ao final das janelas de 8, 20 e 40 dias pós-infecção, os animais foram novamente sujeitos aos testes comportamentais e então, sacrificados (Tabela 2).

Tabela 2. Desenho experimental do grupo dos animais senis.

2 meses de idade		16-20 meses de idade							
Chegada dos animais	Alojamento	Baseline	Inoculação viral	Testes Comportamentais 8DPI	Sacrifício dos animais	Testes Comportamentais 20DPI	Sacrifício dos animais	Testes Comportamentais 40DPI	Sacrifício dos animais
Animais Jovens	Ambiente Enriquecido	B CA DO	AEPY AECT	B CA DO	8DPI	B CA DO	20DPI	B CA DO	40DPI
	Ambiente Padrão	B CA DO	APPY APCT						

2.4 Inoculação Viral

A inoculação do arbovírus Piry foi feita em parceria com o Instituto Evandro Chagas-PA, adotando todos os protocolos de biossegurança da instituição.

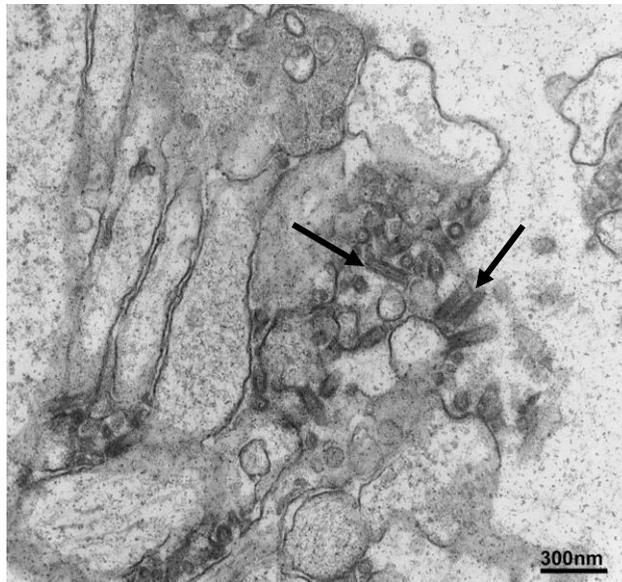
Todos os procedimentos foram realizados em cabines de fluxo laminar classe II B2. As cabines foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 10% antes e após o manuseio de material contaminado com vírus, sendo mantidas sob luz ultravioleta por 1 hora. As carcaças dos animais infectados foram autoclavadas antes de serem encaminhadas para incineração.

Os homogeneizados cerebrais contendo os vírus foram obtidos da seguinte forma: 0,01 ml de cada suspensão viral foi primeiramente inoculados por via intracerebral (IC) em camundongos suíços recém-nascidos. Após a inoculação os camundongos foram observados diariamente e quando apresentaram sinais clínicos

de doença, foram congelados à -70°C até sua utilização. O tecido cerebral (aproximadamente 0,2g) foi macerado em uma mistura de 0,8 ml de solução de Fosfato de sódio-salina (PBS) contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$). A mistura foi centrifugada a 10.000 G durante 15 minutos à temperatura de 4°C . A suspensão produzida (concentração de 10^{-5} v/v) foi inoculada por via intranasal (IN), sendo 5 μl de suspensão em cada narina do camundongo, utilizando micropipeta. Depois da inoculação, os animais foram observados diariamente. Quando apresentavam sinais de doença, ou detectava-se a presença de animais mortos na gaiola, os sobreviventes eram perfundidos.

A figura 7 ilustra a morfologia típica em bala de revólver do arbovírus Piry no córtex cerebral de camundongo neonato utilizado para preparação do homogeneizado cerebral infectado pelo vírus, utilizando a Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Figura 7- Fotomicrografia da partícula viral. Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a presença da partícula viral (setas) no cérebro de camundongos recém nascidos após a inoculação intracerebral com homogeneizado cerebral infectado. Escala 300 nm.



2.5 Testes Comportamentais

Durante a fase pré-inoculação e nas três janelas temporais investigadas todos os grupos experimentais foram submetidos a três testes comportamentais para determinar seus níveis de atividade locomotora, ansiedade e capacidade olfatória:

Campo Aberto (CA), Discriminação Olfatória (DO) e Burrowing (B). Esses testes possuem inúmeras e óbvias vantagens no que diz respeito à economia, rapidez, simplicidade e sensibilidade, acompanhadas pelo fato de que dispensam treinamentos prolongados prévios e privação de água/comida ou o uso de estímulos nociceptivos (PELLOW *et al.*, 1985, p.149; RODGERS, 1997, p.289), reduzindo o estresse durante o período de testes.

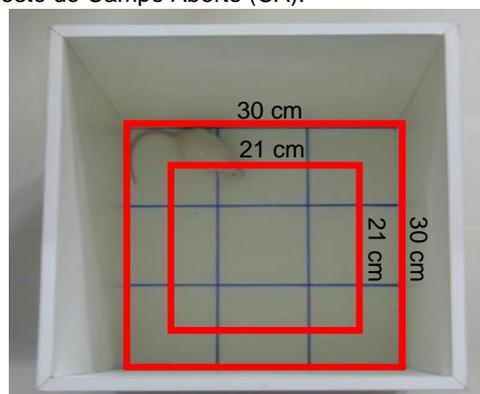
2.5.1 Campo Aberto (CA)

O protocolo utilizado neste teste foi o utilizado por Carola *et al.* (2002, p. 49).

- Equipamento

A tarefa de exploração foi realizada em uma caixa de 30x30x40 cm, feita em compensado com paredes e chão forrados com fórmica branca, com piso dividido em duas regiões: Centro (C) e Periferia (P), onde cada área corresponde a cerca de 50% da área total do aparato (Figura 8). A um metro acima do CA haverá uma câmera de vídeo conectada a um computador, de modo a filmar e armazenar as sessões de amostragem e avaliação, para posteriores análises.

Figura 8 - Caixa utilizada para a realização do teste do Campo Aberto (CA).



- Procedimentos

Este teste durou dois dias consecutivos e consistiu em colocar o camundongo, através de sua cauda, no centro do CA como ponto de partida. Os animais foram expostos ao CA por 5 min nos dois dias de teste. Ao fim de cada sessão de exploração os animais foram retirados do CA, devolvidos às suas gaiolas e o aparelho foi limpo com uma solução de etanol a 70%.

- Parâmetros Analisados

O tempo total gasto pelo animais nas zonas central e periférica foram os



parâmetros analisados como medida para o comportamento semelhante ao ansioso.

2.5.2 Burrowing

Burrowing é uma palavra inglesa que se refere ao comportamento espécie-específico de roedores em remover e estocar comida a partir de uma toca. Além disso, o burrowing é um teste sensível para a detecção de doenças, pois é influenciado por diversos fatores, dentre eles infecções, estresse, avaliação de diferentes estágios da doença Prion em camundongos e lesões hipocâmpais e do córtex préfrontal (BANNERMAN *et al.*, 2004b, p.273).

A toca será simulada por um tubo de PVC de 20 cm de comprimento por 7,2cm de diâmetro, disposto de forma inclinada com a extremidade elevada à 3cm do solo (Figura 9), onde se colocava 250 gramas de ração (NUVILAB). Os animais foram alojados individualmente em gaiolas contendo um único tubo de burrowing que foi disponibilizado por apenas 2 horas por dia, na fase clara do ciclo claro-escuro, e depois retirados. Os restos de ração que ficavam nos tubos foram recolhidos e identificados, para posterior pesagem e análise. Nos animais jovens o teste foi realizado em 13 dias (dois dias no Baseline, 2, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 19, 22 25 e 33DPI), enquanto que nos animais senis foi feito em 14 dias (um dia no Baseline, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 19, 22, 25, 28, 32, 35 e 39DPI).

Figura 9 - Tubo PVC que simula a toca do camundongo no teste do burrowing.

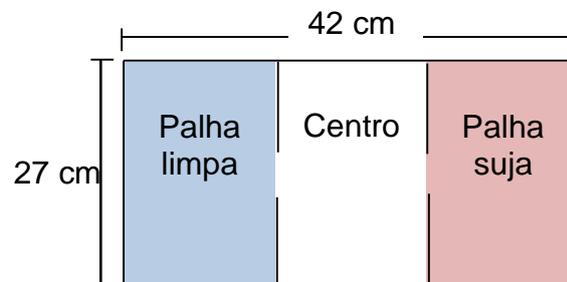




2.5.3 Teste de Discriminação Olfatória (DO)

O teste de discriminação olfatória foi previamente descrito por Soffié e Lamberty (1988, p.181) e avalia a capacidade do animal de diferenciar odores. A palha autoclavada das gaiolas era trocada 48 horas antes da realização do teste para que o odor dos animais pudesse impregná-la. O teste foi realizado em uma caixa dividida em três compartimentos (um central, um contendo palha suja e o outro contendo palha limpa), separados por duas paredes contendo uma porta de 5cm² cada (Figura 10). O animal era colocado no compartimento central de frente para a parede e o seu comportamento era filmado por uma câmera localizada sobre o aparato, durante 5 minutos. Após cada teste o aparato era limpo com álcool a 70% com o objetivo de se remover pistas olfatórias. Como índice de discriminação olfatória avaliou-se o tempo gasto nos compartimentos contendo a palha suja e a palha limpa através do programa Any-Maze (Stoelting®).

Figura 10 - Aparato utilizado para realizar o teste de discriminação olfatória



Fonte: REIS, R.R, 2012.

2.6 Perfusão e craniotomia

Ao fim de cada uma das janelas temporais, todos os animais foram anestesiados com tribromo-etanol intra-peritoneal (IP) e perfundidos transcárdiacamente com salina heparinizada 0,9% por 10 minutos e paraformaldeído 4% por 40 minutos. Os cérebros foram retirados e cortados em vibrátomo em fatias de 70 µm de espessura, e estocados em paraformaldeído a 2% (imunohistoquímicas).



2.7 Estudos Imunohistoquímicos

Para avaliar a relação entre os efeitos causados pela infecção viral por Piry sobre o comportamento (levando em consideração a neuroproteção fornecida pelo enriquecimento ambiental), a perda cognitiva, micróglia, foram utilizadas reações de histoquímica e imunohistoquímica seletivas para: o vírus Piry e micróglia e a contra-coloração foi realizada pela técnica de Nissl.

- **Vírus Piry**

Para identificar a presença dos antígenos virais no SNC foi empregado imunohistoquímica seletiva empregando anticorpo específico contra o vírus Piry, produzido no Departamento de Arbovírus do IEC, seguindo protocolo previamente descrito (SANTOS; BRAGA, 2008, p.30) como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolo utilizado para a imunomarcação para o vírus Piry.

	Solução	Tempo
1	Ácido bórico 0,2M pH 9,0	1 hora a 70°C
2	Tampão fosfato 0,1M Salino 0,9% Triton a 5% pH 7,4	3 x 5 minutos
3	Metanol + peróxido de hidrogênio a 1% (1:1)	10 minutos
4	Tampão fosfato 0,1M Salino 0,9% pH 7,4	3 x 2 minutos
5	Mouse Ig Blocking (12 gotas Stock Solution Mouse Ig Blocking Reagent / 15 ml PBS)	1 hora
6	Tampão fosfato 0,1M Salino 0,9% pH 7,4	3 x 2 minutos
7	Solução de trabalho preparada com concentrado de proteína (120ml protein concentrate / 15 ml PBS)	5 minutos
8	Anticorpo Primário (Anticorpo + MOM diluente): Piry = 1:20 (1µl /20ml) no concentrado de proteína.	3 dias a 4°C
9	Tampão fosfato 0,1M Salino 0,9% pH 7,4	3 x 2 minutos
10	Anticorpo secundário – MOM Biotinylated anti-mouse IgG (60 µl de biotinylated IgG em 15ml da solução de trabalho – 1200 µl de concentrado de proteína/15ml PBS)	12 horas (overnight)
11	Tampão fosfato 0,1M Salino 0,9% pH 7,4	3 x 2 minutos
12	Solução ABC	1 hora
13	Tampão fosfato 0,1M Salino 0,9% pH 7,4	3 x 2 minutos



14	Revelação com GND-reaction (A = 1,25g de Ni + 25 ml de acetato;- B = 30mg DAB + 25ml de água destilada;- C = 100mg ABC de glicose; - D = 40g de cloreto de amônio; - E = glucose-oxidase (1 “pitada”); Adicione A em B, acrescente C e posteriormente D, colocar os cortes e acrescente E	
----	--	--

Os cortes reagidos 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.

- **IBA-1 : Micróglia**

Para identificar a presença das micróglia ativadas no SNC foi empregado imunohistoquímica seletiva utilizando o anticorpo anti-IBA-1 (“Ionized calcium binding adaptor molecule 1”). O IBA1 é uma molécula adaptadora que se liga ao cálcio em macrófagos/micróglia, sendo especificamente expresso nessas células, e regulada durante sua ativação, além de participar da fagocitose em micróglia ativadas (OHSAWA *et al*, 2004, p.844). O protocolo utilizado está descrito Quadro 4.

Tabela 4. Protocolo utilizado para a imunomarcção para as micróglia ativada utilizando o anticorpo anti-IBA-1.

	Solução	Tempo
1	Ácido bórico 0,2M pH 9,0	1 hora a 70°C
2	Tampão tris-salina triton 0,1M a 5% (200ml de tris-salina acrescido de 10 ml de Triton-X) pH 7,4	3 x 5 minutos
3	Tampão Tris-salina	3 x 2 minutos
4	Caseína a 10% (1ml de caseína para 10 ml de H ₂ O)	10 minutos
5	Tampão Tris-salina	3 x 2 minutos
6	Anticorpo Primário (IBA-1 = 1:800 (20µl de anti-Iba-1/10ml de tris-salina)	3 dias a 4°C
7	Tampão Tris-salina	3 x 2 minutos



8	Anticorpo secundário – MOM Biotinylated anti-mouse IgG (40 µl de biotinylated IgG em 10ml de caseína a 10% (10ml de H ₂ O _d /1ml de caseína)	12 horas (overnigt)
9	Peróxido de Hidrogênio + Metanol (360µl de H ₂ O ₂ /36ml de Metanol)	10 minutos
10	Tampão tris-salina pH 7,4	3 x 2 minutos
11	Solução ABC	1 hora
12	Tampão tris 0,1M pH 7,4	3 x 2 minutos
13	Tampão Acetato pH 6,0	5 minutos
14	Revelação com GND-reaction (A = 1,25g de Ni + 25 ml de acetato;- B = 30mg DAB + 25ml de água destilada;- C = 100mg ABC de glicose; - D = 40g de cloreto de amônio; - E = glucose-oxidase (1 “pitada”); Adicione A em B, acrescente C e posteriormente D, colocar os cortes e acrescente E	

Os cortes reagidos foram montados em lâminas gelatinizadas, secos 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.

- **Contra-coloração: Cresil violeta**

O protocolo a ser empregado na técnica para Cresil violeta para os corpúsculos de Nissl inclui a sequência mostrada no Quadro 5, onde poderá ser observado o nível de manutenção das camadas celulares das áreas focadas. Deve-se lembrar que os corpúsculos de Nissl são formados por retículos endoplasmáticos rugosos, sendo responsáveis pela síntese proteica do neurônio.

Tabela 5. Protocolo utilizado para contra-coloração das lâminas.

	Solução	Tempo
1	Álcool etílico 100%	5 minutos
2	Álcool etílico 100% e clorofórmio (1:1)	10 minutos
3	Álcool etílico 95%	3 minutos
4	Álcool etílico 75%	3 minutos



5	Água destilada	Um mergulho
6	Cresil violeta	2 minutos
7	Água destilada	Um mergulho
8	Álcool etílico 80%	3 minutos
9	Álcool etílico 90%	10 minutos
10	Álcool etílico 100% e clorofórmio (1:1)	3 minutos
11	Álcool etílico 95% e ácido acético (15 gotas para 10ml)	1 minuto
12	Álcool etílico 95%	3 minutos
13	Álcool etílico 100% e álcool butílico (1:1)	3 minutos
14	Xileno I	5 minutos
15	Xileno II	5 minutos
16	Selagem da lâmina com Entelan® (Merck)	

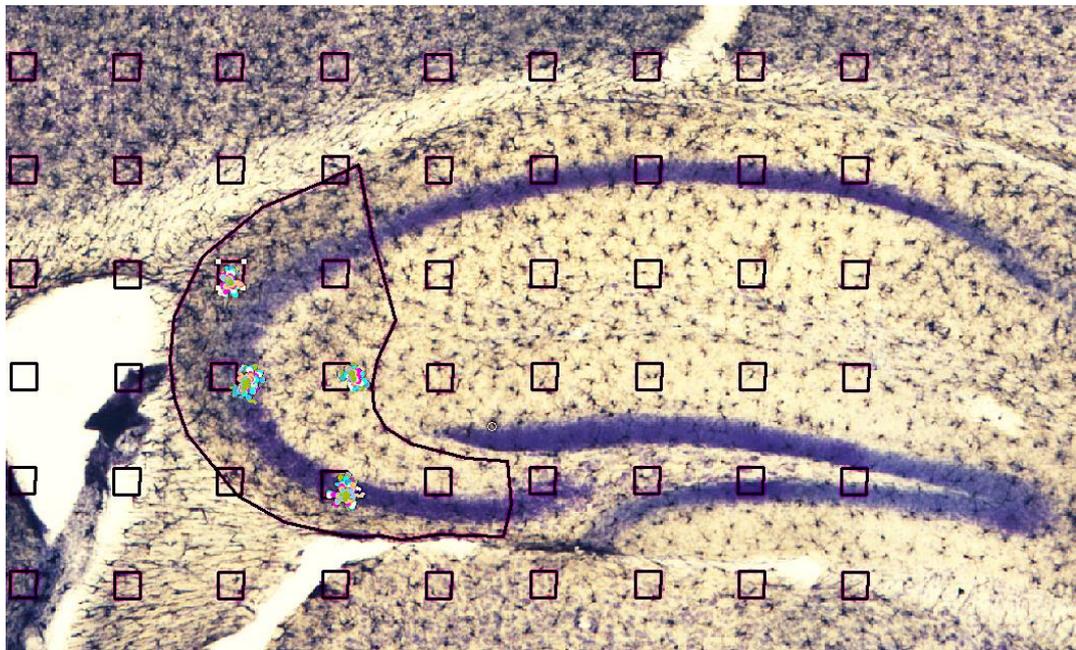
2.8 Morfometria baseada em Reconstrução tridimensional

Em secções coradas por histoquímica para **IBA-1** (micróglia) e contracoradas pela técnica de Nissl, os limites das camadas de CA1, CA2 e CA3 foram feitos de acordo com a citoarquitetonia das secções parasagittais, levando em consideração tamanho e grau de empacotamento das células assim como a laminação.

Para a reconstrução tridimensional das micróglia utilizamos o microscópio óptico (Eclipse 80i, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000 System, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para registro digitalizado da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto da reconstrução. Esse sistema é acoplado a microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (NeuroLucida, MicroBrightfield, Williston, VT, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas reconstruções, a objetiva de 4,0x era substituída por outra PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2 μ m; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais realizadas.

Foram reconstruídas 640 micróglia no total, sendo 80 por grupo experimental na região de CA3 dorsal (Figura 11). Foram selecionadas para reconstrução apenas as micróglia que apresentavam terminações completas. Micróglia seccionadas durante o corte foram excluídas. Adotamos a análise aleatória e sistemática, obtida a partir de uma série de secções, contendo CA3 dorsal para garantir que todas as regiões da CA3 dorsal tivessem a mesma probabilidade de serem incluídas nas amostras. Geramos caixas sobre a área de CA3 de dimensões e espaços entre as caixas conhecidos (caixa: $50 \times 50 \mu\text{m}$; espaço entre as caixas: $200 \times 200 \mu\text{m}$), onde cada caixa, dentro da área de interesse, corresponde a uma micróglia reconstruída, removendo o viés do pesquisador (Figura 11) Aplicamos correção para retração induzida pelo processamento histológico nos dados da morfometria de forma linear para todos os grupos experimentais exclusivamente para o eixo z, onde, presumiu-se 75% de retração tal como previamente sugerido (CARLO; STEVENS, 2011, p.2803).

Figura 11. Área de interesse (CA3) e demonstração da análise sistemática e aleatória



O estudo morfológico fornece dados para uma análise qualitativa e quantitativa e permite também a determinação da distribuição dos objetos de interesse reconstruídos (ACSÁDY, *et al.*, 1998, p.3386). Medimos e comparamos 21 parâmetros morfológicos nas micróglia: 10 relacionados ao soma e 11 relacionados aos ramos, do seguinte modo: 1. Comprimento dos ramos (μm); 2. Comprimento total



da árvore (μm) 3. Área superficial (μm^2); 4. Volume dos ramos (μm^3); 5. Segmentos/mm; 6. Tortuosidade; 7. Dimensão fractal (k-dim); 8. Diâmetro da base do ramo primário (μm); 9. Número total de segmentos; 10. Ângulo planar; 11. Número de árvores; 12. Área do soma (μm^2); 13. Perímetro do soma; 14. Diâmetro Feret mínimo; 15. Diâmetro Feret máximo (diâmetro máximo em uma forma); 16. Compactação; 17. Fator forma; 18. Solidez; 19. Esfericidade; 20. Índice de Aspecto; e 21. Convexidade. Esses parâmetros morfológicos (Tabela 6) foram utilizados para investigar os possíveis fatores compartilhados pelas micróglia em CA3.

Tabela 6. Parâmetros morfológicos medidos nas micróglia reconstruídas: 10 relacionados ao soma e 11 relacionados aos ramos.

Análise da estrutura dos ramos	
Segmentos	Qualquer parte da estrutura ramificada microglial com terminações que são nós ou sem nós intermediários
Comprimento do segmento	O comprimento total do segmento de traçado
Segmentos/mm	Número de segmentos / comprimento total dos segmentos expressa em milímetros
Comprimento do ramo	Comprimento total da linha dos segmentos utilizados para traçar o ramo de interesse (Figura 12)
Comprimento total da árvore	Comprimento total de todos os ramos da árvore = [Comprimento] / [Número de ramos]
Tortuosidade	= [Comprimento real do segmento] / [Distância entre os pontos do segmento]. O menor valor é 1; isto representa um segmento reto. Tortuosidade permite que os segmentos de diferentes comprimentos possam ser comparados em termos da complexidade dos caminhos que tomam (Figura 13)
Área superficial	Calculado através de modelagem de cada ramo como um
Volume dos ramos	Calculado através de modelagem de cada peça de cada ramo como um tronco
Diâmetro da base do ramo primário	Diâmetro inicial do 1º segmento (Figura 12 e Figura 15)
Ângulo planar	Calculado com base nos pontos finais dos segmentos. Refere-se a mudança de direção de um segmento em relação ao segmento precedente (Figura 15)
K-dim (Dimensão fractal)	O "k-dim" da análise fractal, descreve como a estrutura de interesse ocupa o espaço. Diferenças estatísticas significativas no K-dim sugerem diferenças morfológicas (Figura 16)
Número de Varicosidades, segmentos e árvores	Refere-se ao número total de varicosidades, segmentos e árvores encontrados em uma única célula microglial
Corpo celular	
Área	Refere-se a área transversal da secção bi-dimensional contidas dentro do limite do corpo celular (Figura 12)
Perímetro	Comprimento do contorno representativo do corpo celular (Figura 12)
Feret máx / min	Dimensões maiores e menores do corpo celular como se um paquímetro fosse utilizado para medir todo o contorno. As duas medições são independentes uma da outra, e não necessariamente em ângulos retos entre si.
Índice de aspecto	= [Diâmetro mínimo] / [Diâmetro máximo] Indica o grau de achatamento do corpo celular: • Faixa de valores é de 0-1. • Um círculo tem valor de 1.
Compactação	Compactação = $\frac{\sqrt{\frac{4}{\pi}} \times \text{Area}}{\text{Max Diam}}$

	<ul style="list-style-type: none"> • Faixa de valores é de 0 a 1. • Um círculo é a forma mais compacta (= 1).
Convexidade	<p>Convexidade = [Perímetro convexo] / [Perímetro]</p> <p>Um objeto completamente convexo não tem entalhes, e tem um valor de convexidade igual a 1 (por exemplo, círculos, elipses e quadrados).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Objetos côncavos tem valores de convexidade menores que 1. • Contornos com baixa convexidade tem grandes bordas entre as áreas de dentro e fora
Fator forma	<p>$Form\ factor = 4\pi \times \frac{Area}{perimeter^2}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • À medida que a forma de contorno se aproxima de um círculo perfeito, esse valor se aproxima de 1,0. • À medida que a forma de contorno achata, esse valor se aproxima de 0. (Figura 14)
Esfericidade	<p>Esfericidade = [Compactação]² (Figura 14)</p> <p>É usado para diferenciar objetos que possuem pequenos valores de compactação</p>
Solidez	<p>Solidez = [Área] / [Área convexa]</p> <p>A área delimitada por um 'elástico esticado' em torno de um contorno, é chamada de área convexa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Círculos, quadrados e elipses têm uma solidez com valor de 1. • Os entalhes na área do contorno afasta da zona convexa, diminuindo a área real dentro do contorno.

Figura 12 – Medidas do soma e dos ramos.

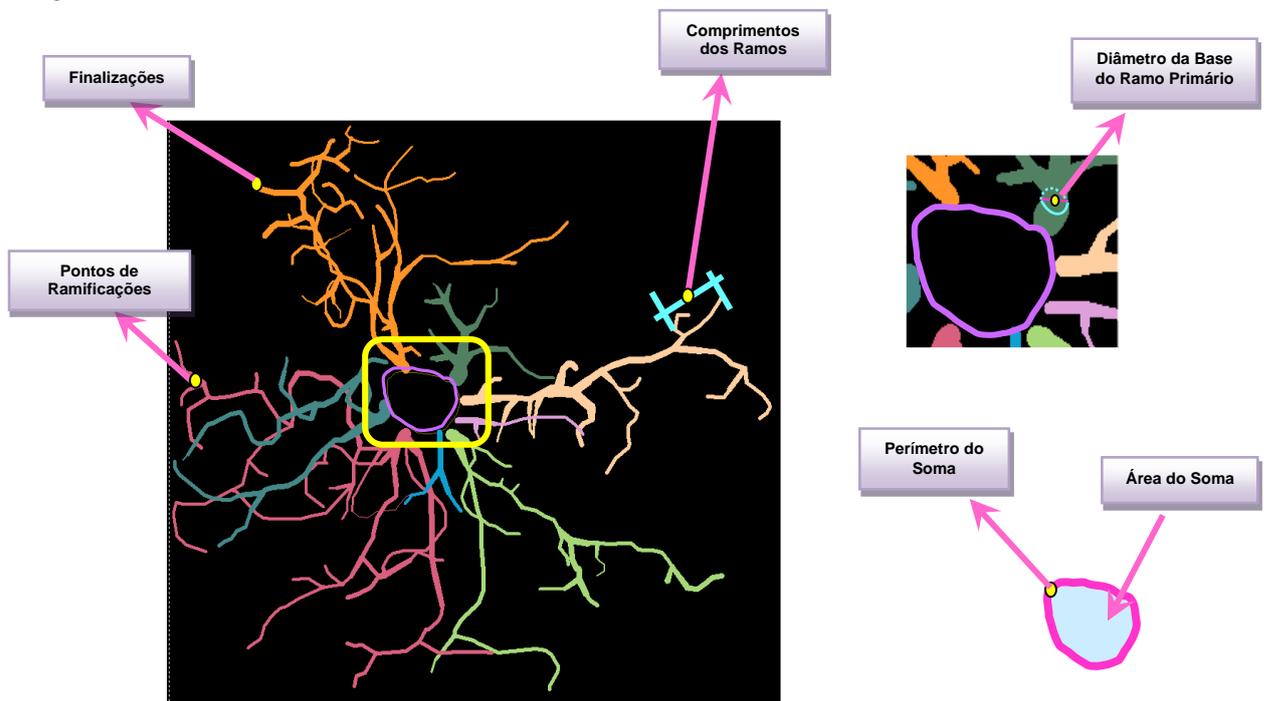
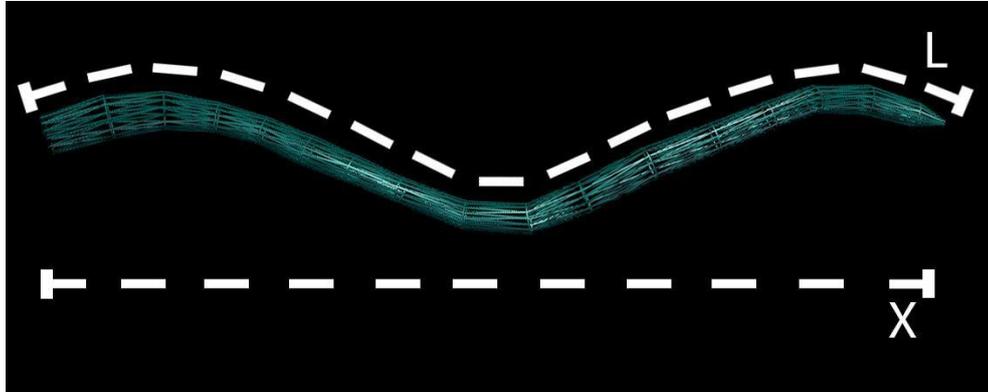


Figura 13 – Conceito de tortuosidade de um ramo microglial. O valor da tortuosidade de um ramo microglial é definido pela razão L/X onde L representa o comprimento real do ramo microglial e X a menor distância entre as extremidades do ramo em questão.



Fonte: Extraída de Guerreiro-Diniz, 2013.

Figura 14 - Figuras com variações em suas formas comparadas por seu fator de forma ("form factor") e circularidade ("roundness") (Russ e Rovner, 1989).

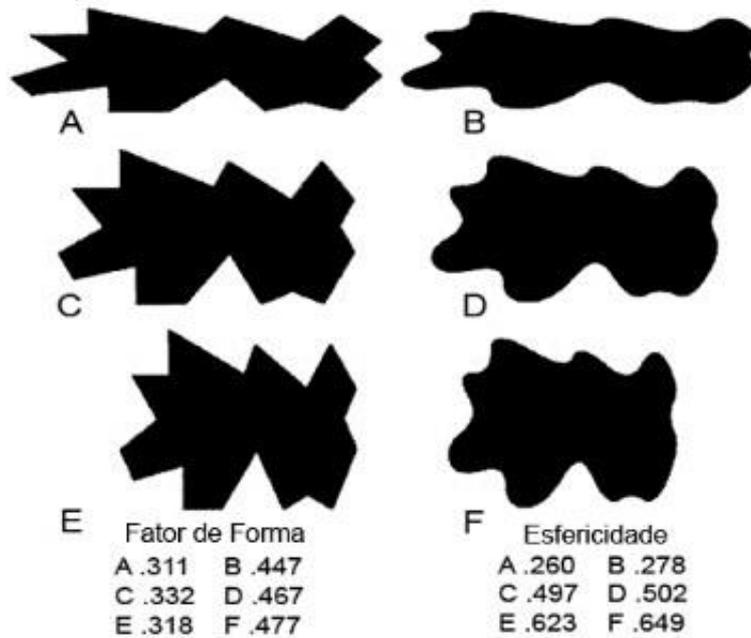
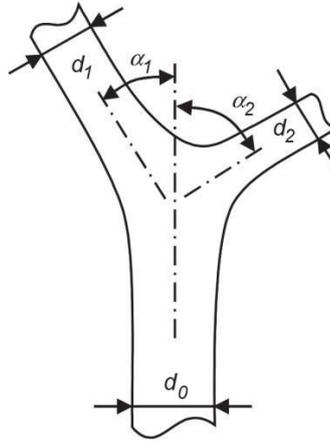


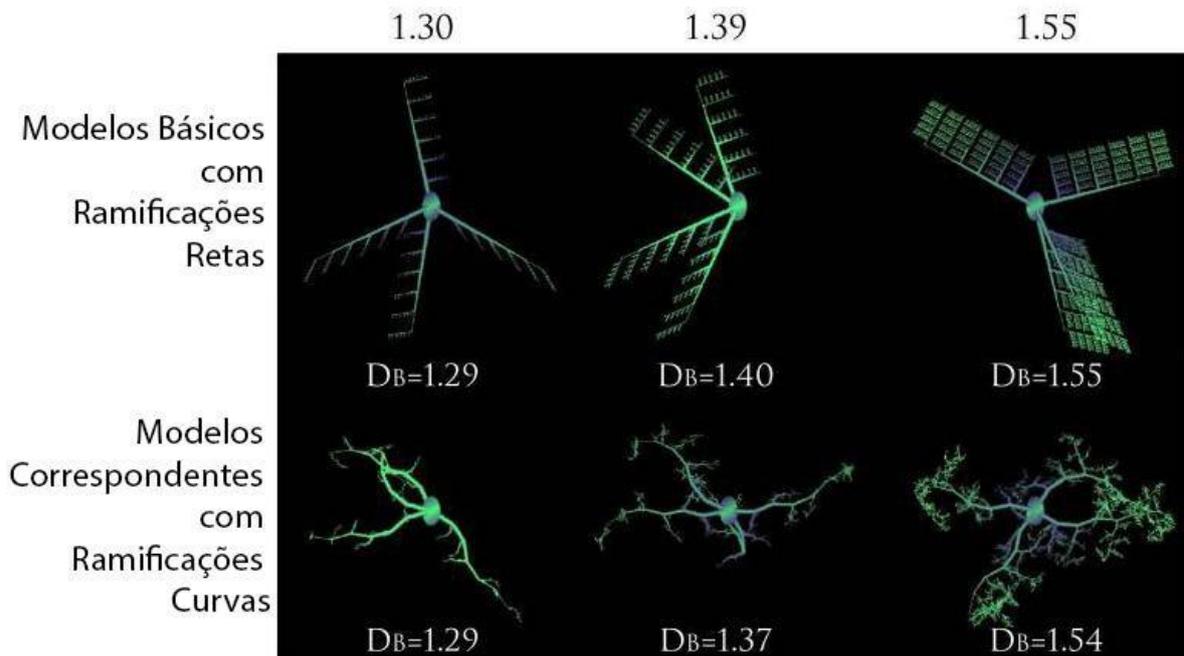
Figura 15 – Conceito de ângulo planar. A geometria de um ramo é caracterizada pelo diâmetro dos ramos primários (d_0), e dos ramos secundários (d_1, d_2) e pelos ângulos planares formados entre esses ramos (α_1, α_2). (Shefi *et al.*, 2004).



Fonte: Extraída de Guerreiro-Diniz, 2013

Figura 16 – Ilustração demonstrando os padrões de ramificação das micróglias, através da análise da dimensão fractal. A Dimensão Fractal reflete a complexidade de padrões de ramificação. As estruturas ramificadas foram geradas por modelagem computacional de acordo com regras preestabelecidas. Em cada nova ramificação a relação entre os comprimentos do ramo parental e do novo ramo foram alteradas para mostrar como as propriedades dos ramos influenciam a dimensão fractal e a dimensão de caixa de contagem. Em ambas as séries a direção permitida para o crescimento do ramo foi aleatória. A única diferença entre as duas séries está na curvatura permitida aos processos. Os valores para a dimensão de caixa de contagem são médias para grupos similares e não representam apenas os modelos mostrados na figura. Modelado com o software Micromod Free (Karperien, 1999; Jelinek *et al.*, 2002).

Dimensão Fractal



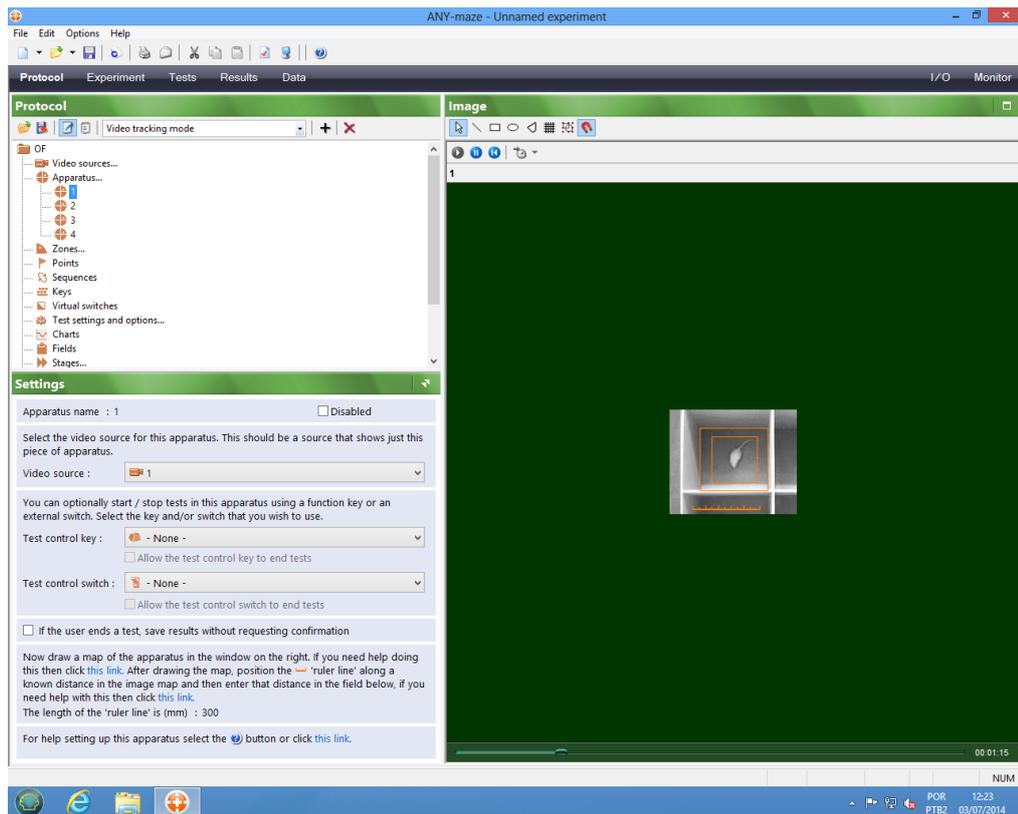
Fonte: Extraída de Guerreiro-Diniz, 2013.



2.9 Análise dos dados comportamentais

Para analisar o ensaio comportamental dos diferentes grupos foi utilizado *software* Any Maze Stoelting® (Figura 17) que é especializado em medir parâmetros comportamentais importantes, e assim contribuindo para investigar com maior resolução se as condições de alojamento (ambiente enriquecido e ambiente padrão) afetam o comportamento de animais de foram submetidos à infecção viral. Para isso é feita a análise automática de imagens capturadas por câmera de TV durante todo o período de testes.

Figura 17 – Tela com o menu do *Software* Any Maze Stoelting® utilizado na análise dos vídeos dos testes comportamentais.





2.10 Análise Estatística

Para analisar os testes comportamentais utilizou-se o teste t ora empregando em suas formas aplicadas a amostras relacionadas ou a duas amostras independentes, com níveis de confiança estabelecidos em 95 ou 99% ($p < 0.05$ ou $p < 0.01$).

Para a análise estatística foram utilizados os Programas: BioEstat® 5.0; Statistical for Windows® version 5.0 A; GraphPad Prism 5 for Windows®.

Em raras ocasiões valores extremos foram detectados e excluídos de todas as amostras com base em análises da normalidade. A análise de variância (ANOVA um critério) foi aplicada para estimar possíveis diferenças entre os animais.



3. RESULTADOS

3.1 Percentual de Mortalidade após a Inoculação Viral

No início do experimento utilizamos 174 camundongos suíços albinos fêmeas e adultos, com 2 meses de idade, Esses animais foram distribuídos, primeiramente, em dois grupos experimentais de acordo com a condição de alojamento: Ambiente Padrão (AP) e Ambiente Enriquecido (AE). A partir de então eles foram separados em dois outros grupos de acordo com a idade: 6-10 meses (animais adultos – 59 animais) e 16-20 meses (animais senis – 115 animais). Os animais adultos adultos pertencem ao trabalho de SOUSA *et al.*, 2011 e à dissertação de mestrado de REIS, R.R., 2012

Após a inoculação os animais jovens e senis dos Ambientes Padrão e Enriquecido apresentaram taxas de mortalidade diferentes até o 7^o e 8^o dias pós-inoculação:

ADULTO: o APPyA obteve uma taxa percentual de mortalidade de 9,67%, enquanto que o AEPyA obteve 17,85%, mostrando uma diferença no percentual de mortalidade de 8,19% entre os dois grupos. Os animais jovens infectados começaram a morrer aos 7DPI.

SENIL: o APPyS obteve uma taxa percentual de mortalidade de 54,90%, enquanto que o AEPyS obteve 67,19%, mostrando uma diferença no percentual de mortalidade de 12,29% entre os dois grupos. Dois animais de APPyS morreram já aos 3DPI e 4DPI (um animal em cada uma dessas janelas), enquanto que os animais de AEPyS só começaram a morrer aos 7DPI, coincidindo com o pico da infecção como descrito em trabalhos anteriores. Os animais que sobreviveram ao pico da infecção (7 e 8 DPI) seguiram até o final do experimento, sendo sacrificados na janela temporal correspondente.

3.2 Teste de Remoção e Estocagem de Comida ou Burrowing (B).

Em animais adultos, a quantidade de Burrowing diminuiu no 8DPI (coincidindo com o pico da infecção que é de 7 a 8 DPI) somente no grupo dos animais que pertencem ao ambiente padrão, mas se recuperam em 10DPI e nenhuma alteração na quantidade de comida foi observada em animais de AE (Figura 18). Os dois grupos de animais senis que foram inoculados com arbovírus Piry (AEPy e APPy)

apresentaram um declínio significativo na quantidade de comida retirada e estocada durante o período de pico da infecção aos 7DPI, em relação ao Baseline (ver Figura 19; *ANOVA um critério para medidas repetidas $p < 0,05$, $t=3,24$). Após a infecção, esse declínio permaneceu nos grupos infectados independentemente do ambiente (# ANOVA dois critérios $p < 0,05$) (ver Figura 19). Esses dados mostram que a infecção pelo arbovírus Piry influencia significativamente (ANOVA dois critérios, $F_{1,23} = 6,07$, $p = 0,0217$) o comportamento desses animais neste teste, e que o enriquecimento ambiental não protegeu durante o pico da infecção e nem auxiliou na recuperação após esse período até o final do experimento aos 39DPI.

Figura 18 - Gráfico representativo do teste de remoção e estocagem de comida ou Burrowing em animais adultos. * $p < 0,05$, ANOVA um critério, Bonferroni *a priori*.

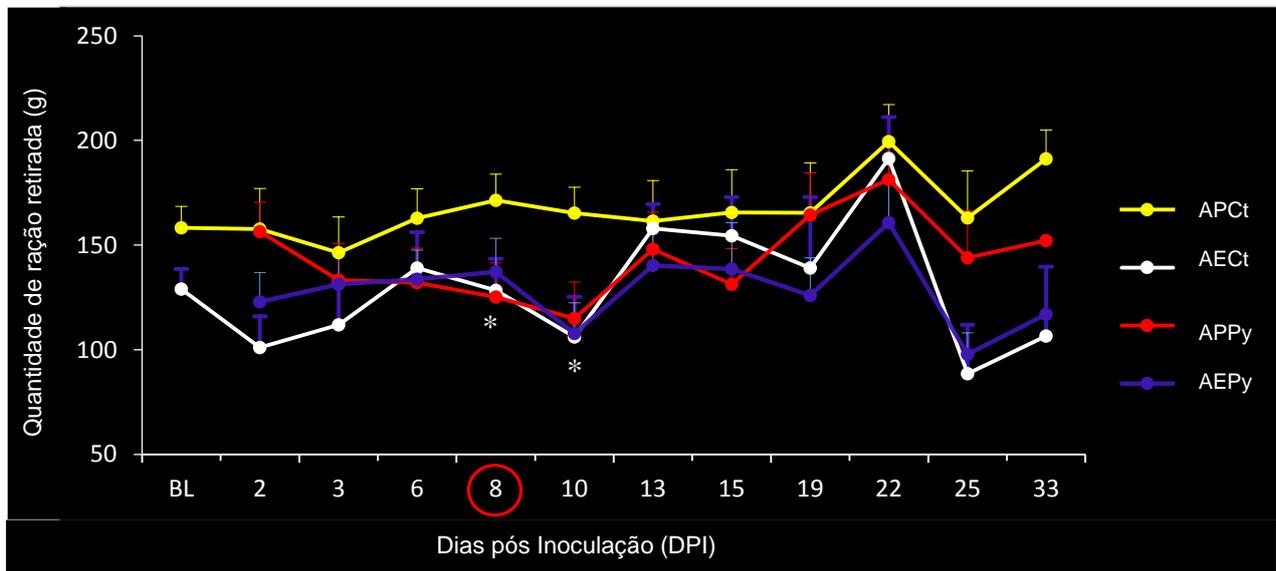
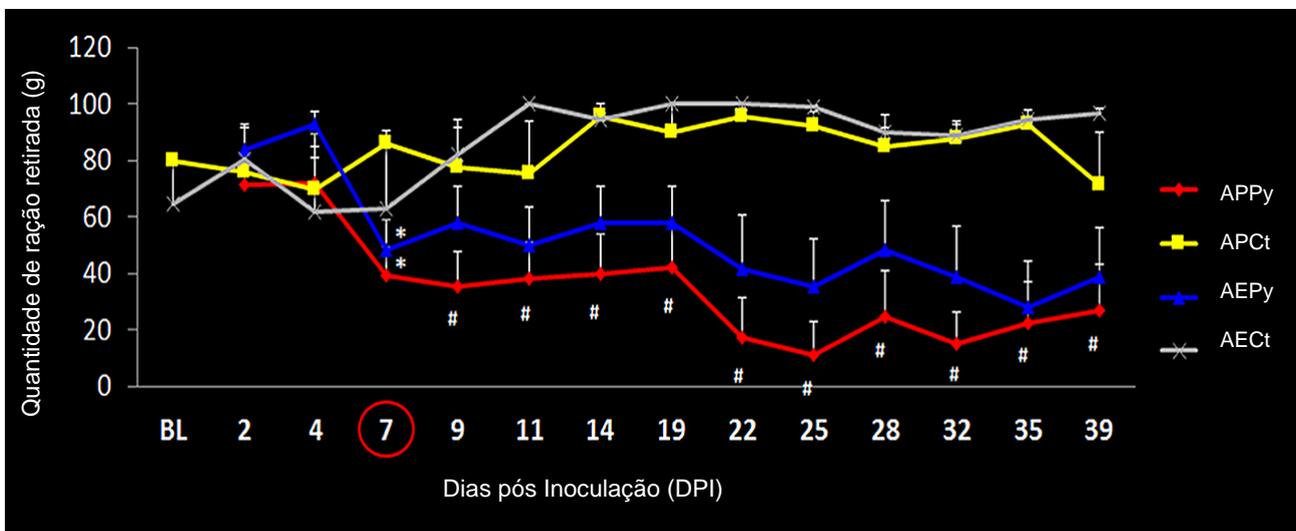


Figura 19 - Gráfico representativo do teste de remoção e estocagem de comida ou Burrowing em animais senis. Os dois grupos de animais que foram inoculados pelo arbovírus Piry (AEPY e APPY) apresentaram um declínio significativo em relação ao Baseline (BL) (* ANOVA um critério para medidas repetidas $p < 0,05$, $t=3,24$). Note que 7 dias após a infecção, não importa o ambiente de alojamento dos animais, a atividade de Burrowing permanece reduzida mantendo-se assim até os 39DPI (# ANOVA dois critérios $p < 0,05$)



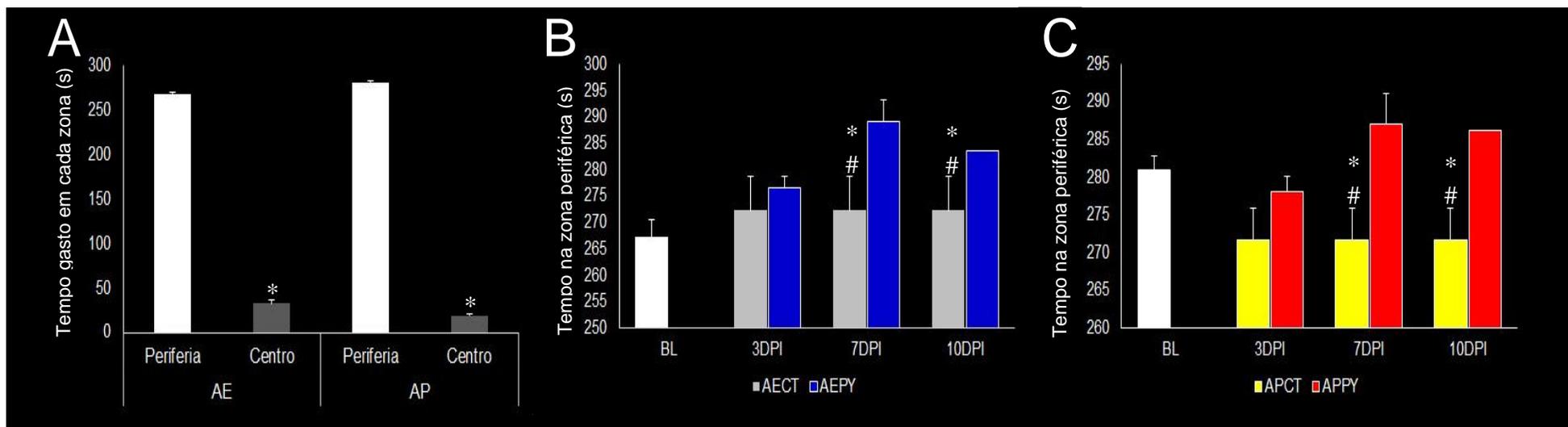


3.3 Campo Aberto (CA)

No teste do CA, tanto os animais adultos quanto os senis, preferem a zona periférica (P) à zona central (C) do aparato, por se sentirem mais protegidos, como mostrado pelo Baseline e pelos animais controles (Figura 20A e Figura 21A).

Animais adultos, independente do ambiente, aumentam o tempo gasto na zona periférica do campo aberto na janela de 7DPI, junto com o pico da infecção (7-8DPI), permanecendo assim até 10DPI (Figura 20B e 20C). Esses resultados são oriundos da dissertação de REIS, R.R., 2012, onde as janelas temporais são diferentes do presente trabalho (3, 7 e 10DPI), mas que são perfeitamente comparáveis quanto ao pico da infecção.

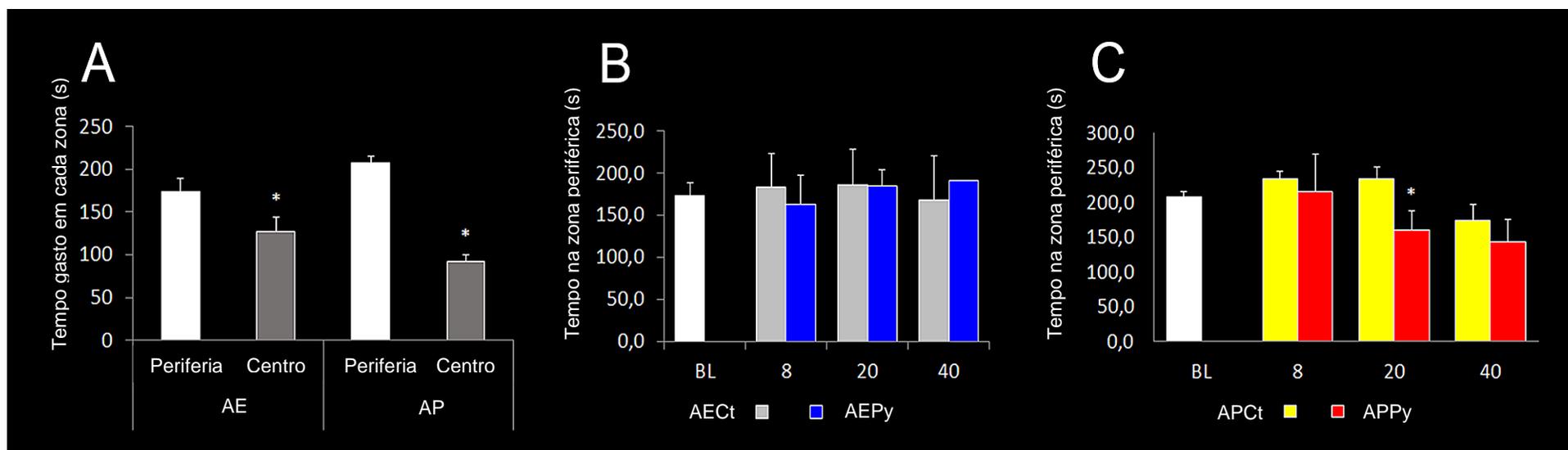
Figura 20. Gráficos do teste de Campo Aberto em animais adultos. Note a preferência natural pela zona periférica do aparato (A), o aumento no tempo gasto na região periférica do aparato aos 7DPI, permanecendo até 10DPI, independente do ambiente ao qual o animais pertença (B e C). * diferença significativa em relação ao Baseline e # diferença significativa em relação ao seu controle. ANOVA um critério. *#<0,05.





Em animais senis, o comportamento natural é mantido na fase de baseline (Figura 21A). Entretanto, nenhuma diferença comportamental é vista em animais de AE (Figura 21B) e somente aos 20DPI os animais de APPy apresentam alterações de comportamento nesse teste (Figura 21C)

Figura 21. Gráficos do teste de Campo Aberto em animais senis. Note a preferência natural pela zona periférica do aparato (A), nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais de AE (B), porém há uma diminuição no tempo gasto na periferia pelos animais de AP de forma tardia, somente aos 20DPI, recuperando-se aos 40DPI (C). ANOVA um critério. * $<0,05$.

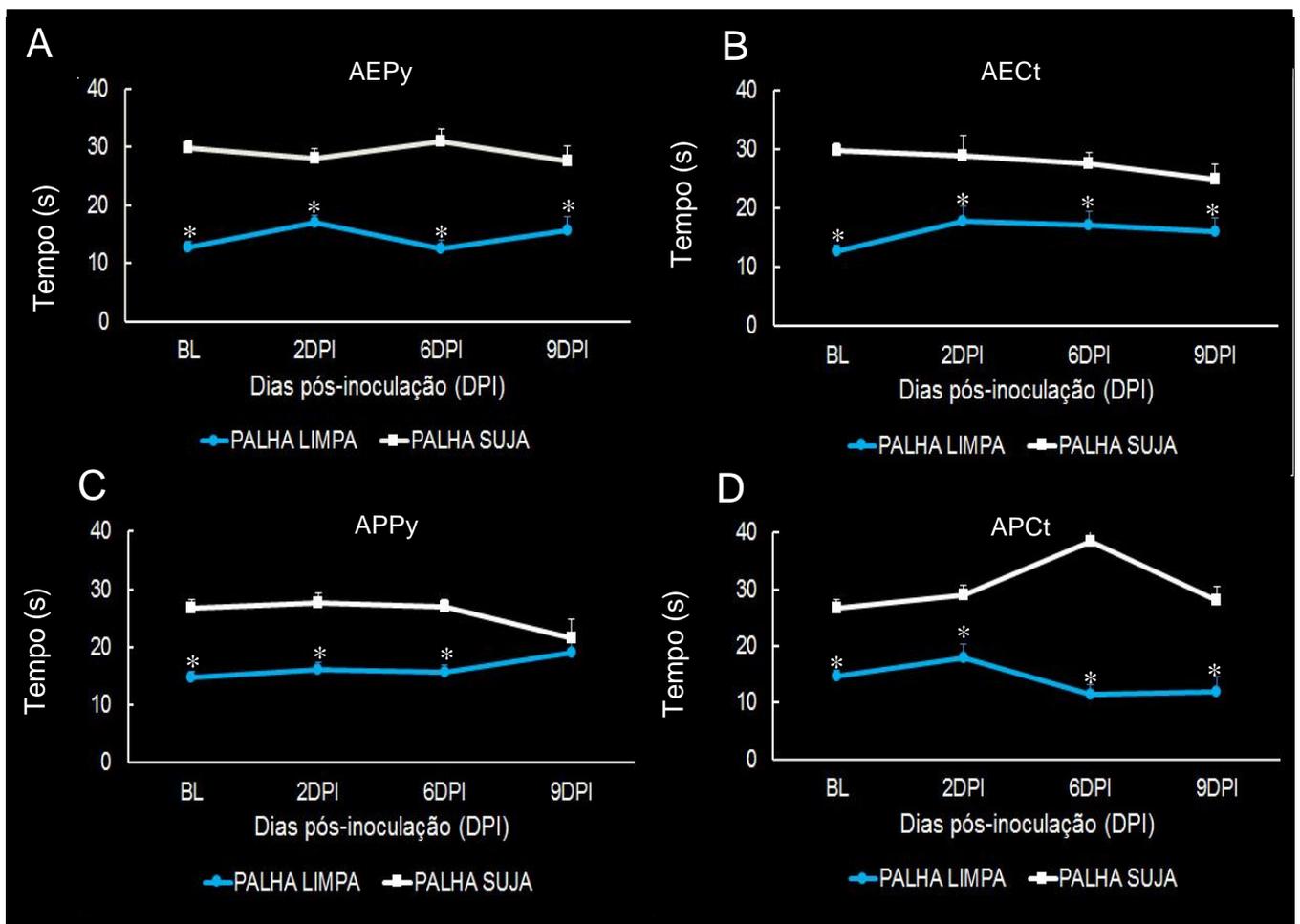


3.4 Discriminação Olfatória (DO)

A análise dos resultados do teste de discriminação olfatória confirmou que o comportamento natural e esperado dos camundongos, independentemente da idade e do ambiente no qual foram mantidos (AE ou AP), é a preferência pela palha, cujo odor ele reconhece (palha suja ou familiar - PS) ao invés da palha cujo odor ele desconhece (palha limpa ou nova - PL) como mostrado nos animais controle e no Baseline (Figuras 22B e 22D para animais adultos e Figuras 23B e 23D para animais senis).

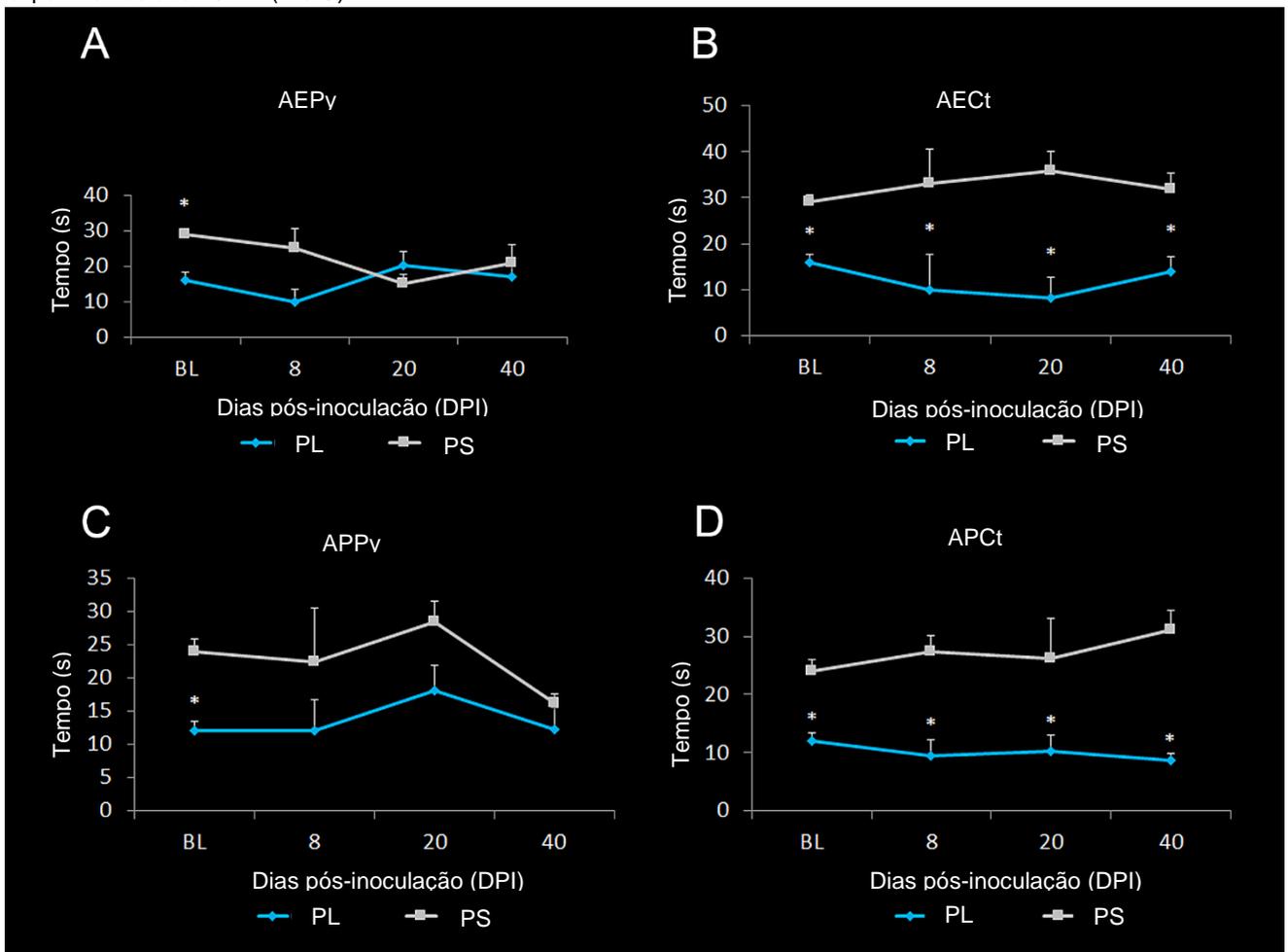
Em animais adultos, o grupo APPy perde a preferência natural pela PS aos 9DPI (Figura 22C), porém os animais de AEPy não sofrem qualquer alteração no padrão de preferência (Figura 22A). Esses resultados são oriundos da dissertação de REIS, R.R., 2012, onde as janelas temporais são diferentes do presente trabalho (2, 6 e 9DPI), mas que são perfeitamente comparáveis quanto ao pico da infecção.

Figura 22. Gráficos do teste de discriminação olfatória dos animais adultos. Animais adultos de AP perdem a preferência pela palha familiar (palha suja) na janela de 9DPI, próximo ao pico da infecção (Figura 22A), enquanto que não há alteração no padrão normal dos animais de AE (Figura 22B). ANOVA um critério. * $<0,05$.



Em contraste, animais senis infectados independentemente do ambiente ao qual pertençam, apresentam a preferência natural pela zona periférica somente no baseline, pois após a infecção perdem essa diferenciação até o final do experimento (40DPI) (Figura 23A e 23C)

Figura 23 - Gráficos do Teste de Discriminação Olfatória (DO) em animais senis. Naturalmente os camundongos tendem a preferir a palha familiar (PS) ao invés da palha cujo odor ele não reconhece (PL) como mostrado pelo baseline (BL) e pelos animais controles (B e D). Após a inoculação os animais tendem a perder essa preferência pela PS até o final dos experimentos aos 40DPI (A e C).

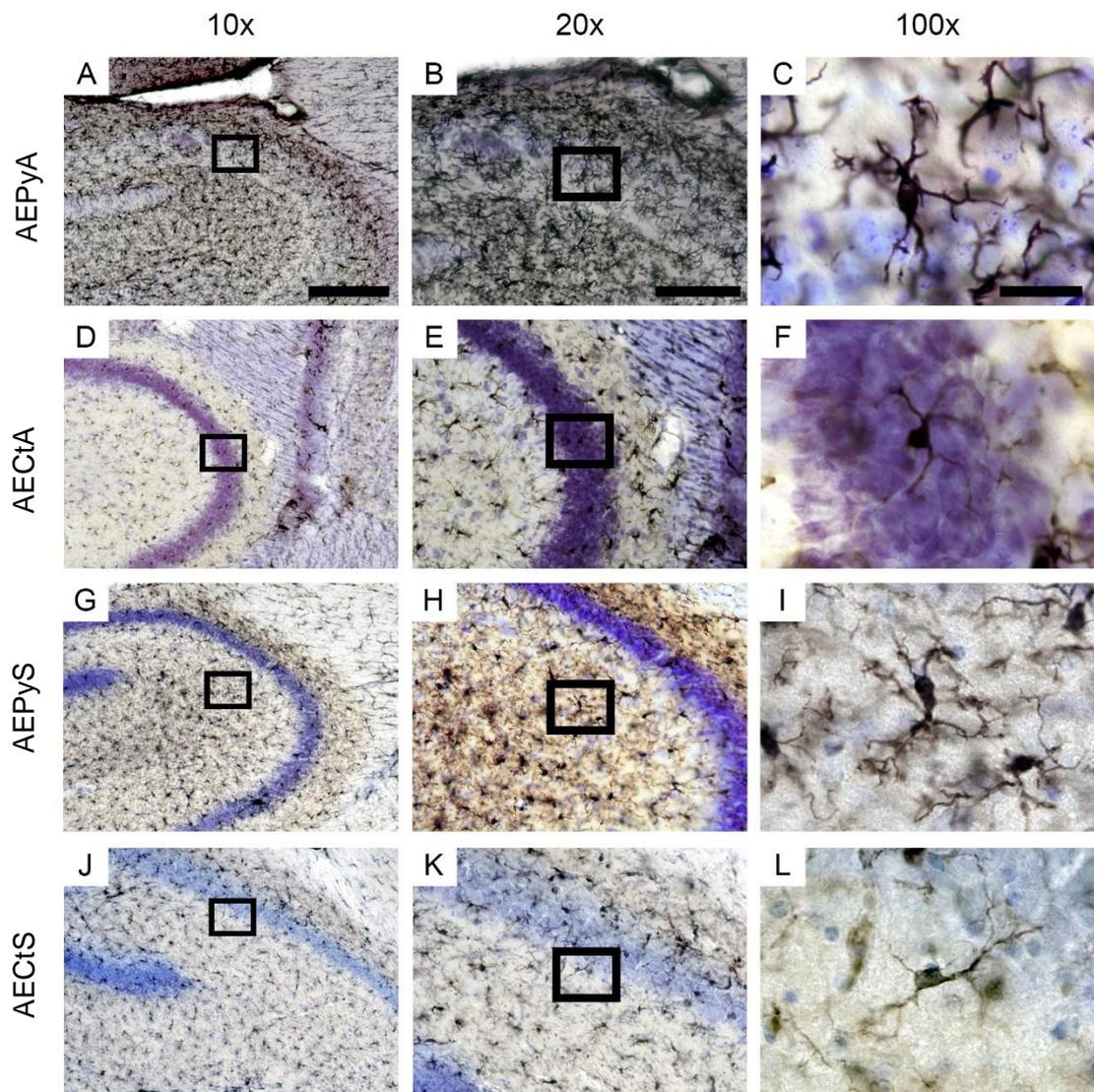


3.5 Diferenças Qualitativas no Fenótipo das Micróglia em CA3 Dorsal.

As imunomarcações para micróglia feitas com o anticorpo anti-IBA1 nos animais experimentais (APPy e AEPy) e controles (APCt e AECt) aos 8DPI (utilizando objetivas de 10X, 20X e 100X), mostraram que todos os animais dos grupos infectados (AEPy e APPy) apresentaram as alterações morfológicas características de micróglia ativadas.

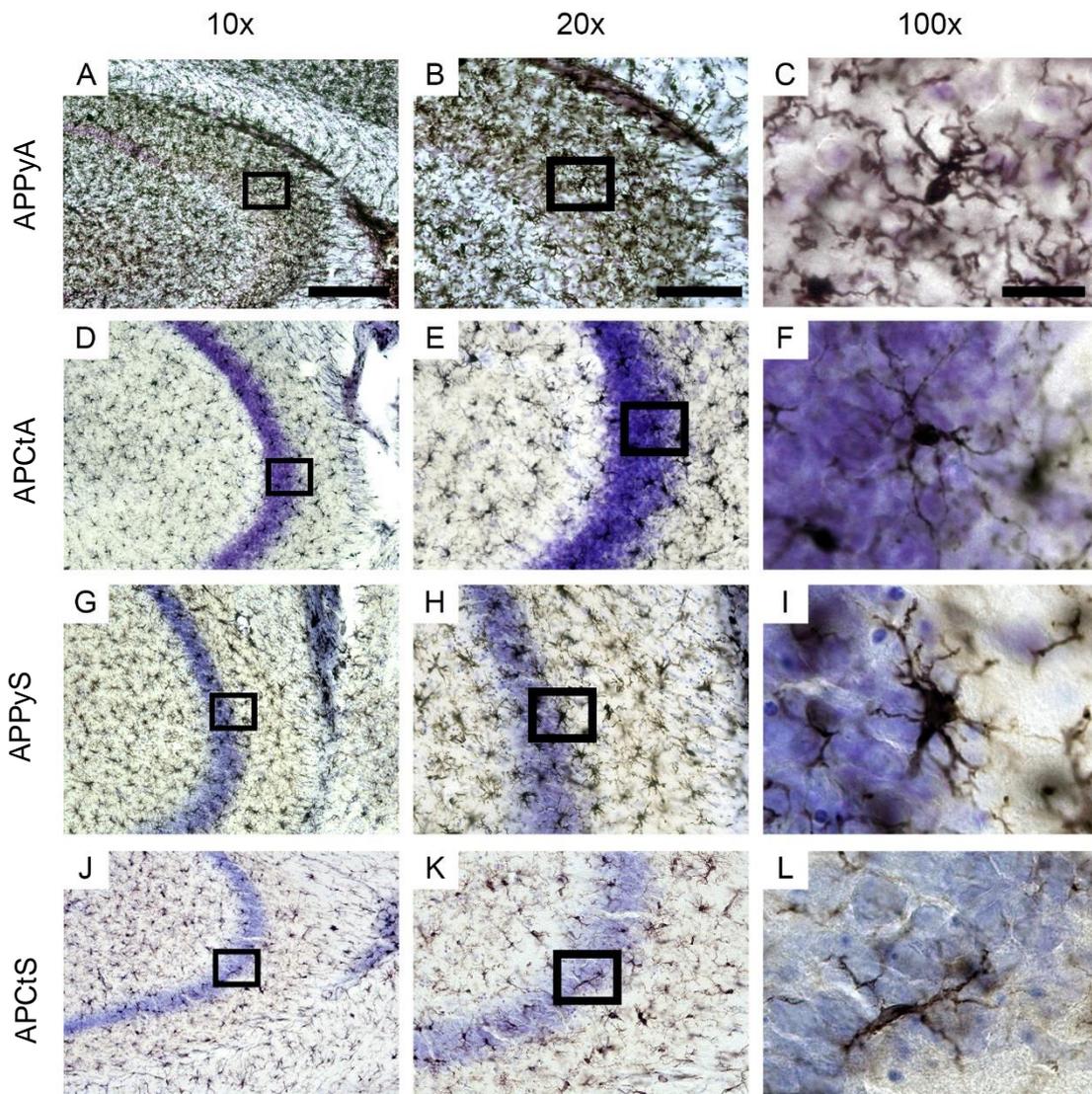
A Figura 24, mostra as micróglias médias, na região de interesse (CA3), dos grupos dos animais de Ambiente Enriquecido Adulto Infectados pelo vírus Piry (AEPyA), o animais de Ambiente Enriquecido Senil Infectados pelo vírus Piry (AEPyS) e os animais controles de Ambiente Enriquecido Adulto (AECtA) e de Ambiente Enriquecido Senil (AECtS).

Figura 24. Fotomicrografias das micróglias em CA3 nos grupos de AE adulto e senil. Fotomicrografias nos aumentos de 10X, 20X e 100X



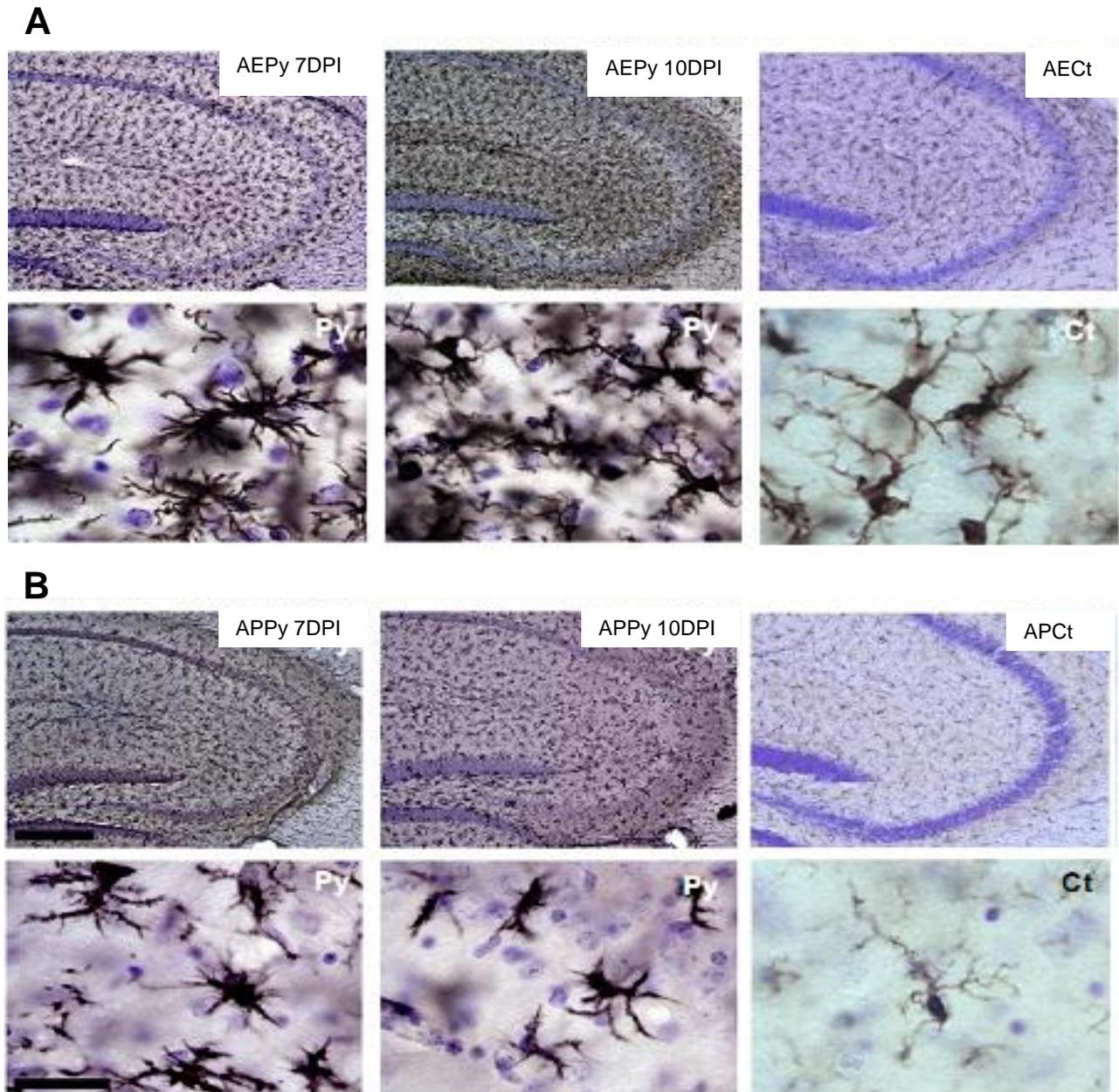
A Figura 25, mostra as micróglia médias, na região de interesse (CA3), dos grupos dos animais de Ambiente Padrão Adulto Infectados pelo vírus Piry (APPyA), o animais de Ambiente Padrão Senil Infectados pelo vírus Piry (APPyS) e os animais controles de Ambiente Padrão Adulto (APCtA) e de Ambiente Padrão Senil (APCtS).

Figura 25. Fotomicrografias das micróglia em CA3 nos grupos de AP adulto e senil. Fotomicrografias nos aumentos de 10X, 20X e 100X



Camundongos senis de ambiente enriquecido infectados (AEPyS) apresentam recuperação da morfologia microglial homeostática mais cedo, do que indivíduos da mesma idade, mas ambiente padrão (Figura 26A). De fato, aos 10DPI a morfologia das micróglia de animais infectados é mais próxima à morfologia dos animais não infectados (Figura 26B).

Figura 26. Fotomicrografias das micróglias dos animais senis infectados aos 7 e 10DPI. As micróglias de animais senis de AE parecem se recuperar mais rápido da infecção, pois o fenótipo microglial aos 10DPI é mais semelhante ao fenótipo de uma micróglia controle (A), porém isso não é visto em animais de AP (B). Aumento de 10X e 100X.



3.6 Análise Morfométrica das Micróglias Imunomarcadas com IBA-1.

Um total de 640 células microgliais foram digitalmente reconstruídas em três dimensões na região de CA3 dorsal do camundongo suíço albino fêmea, sendo 80 células por grupo. As Figuras 27 e 28 mostram as representações gráficas dos vários fatores morfológicos microgliais para ilustrar as diferenças significantes entre infectados e não infectados, adultos e senis, alojamento em



AE ou AP. ANOVA três critérios, comparações pareadas para grupos independentes - honestly significant difference (diferenças honestamente significantes) (HSD), foram utilizados para investigar as influências da idade, infecção e meio ambiente sobre as características morfológicas da microglia. Diferenças significativas foram definidas para comparações pareadas como [Q = Tukey HSD: $p < 0,05$, ou $p < 0,01$] e esta análise revelou que a idade, o ambiente e a infecção influenciaram muito nas características morfológicas da microglia de CA3 dorsal. Em alguns casos todas as variáveis (ambiente, idade e infecção) interagiram e influenciaram nas mudanças microgliais, como segue: volume dos ramos ($F_{1,632} = 11.1$; $p < 0.0009$); diâmetro da base do ramo primário ($F_{1,632} = 20.3$; $p < 0.000008$); segmentos/mm ($F_{1,632} = 14.3$ $p < 0.0002$); Comprimento médio dos ramos ($F_{1,632} = 13.8$ $p < 0.00022$); K-dim (dimensão fractal) ($F_{1,632} = 10.2$ $p < 0.00151$); ângulo planar ($F_{1,632} = 10.6$ $p < 0.0012$); Feret máx ($F_{1,632} = 5.34$; $p < 0.02$); Fator forma ($F_{1,632} = 5.61$ $p < 0.0182$) e convexidade ($F_{1,632} = 22.9$ $p < 0.000002$).

Selecionamos nas Figuras 27 e 28 as representações gráficas dos valores médios e erros padrão correspondentes para os fatores morfológicos microgliais dos ramos e do corpo celular que mais contribuiriam para distinguir os grupos experimentais (detalhes ver Tabela 7)



Figura 27: Gráficos representativos dos parâmetros morfométricos relacionados aos ramos e ao soma das micróglias reconstruídas tridimensionalmente. Representações gráficas dos parâmetros morfométricos que mais contribuíram para distinguir os grupos experimentais. + Idade; # Ambiente; * Piry.

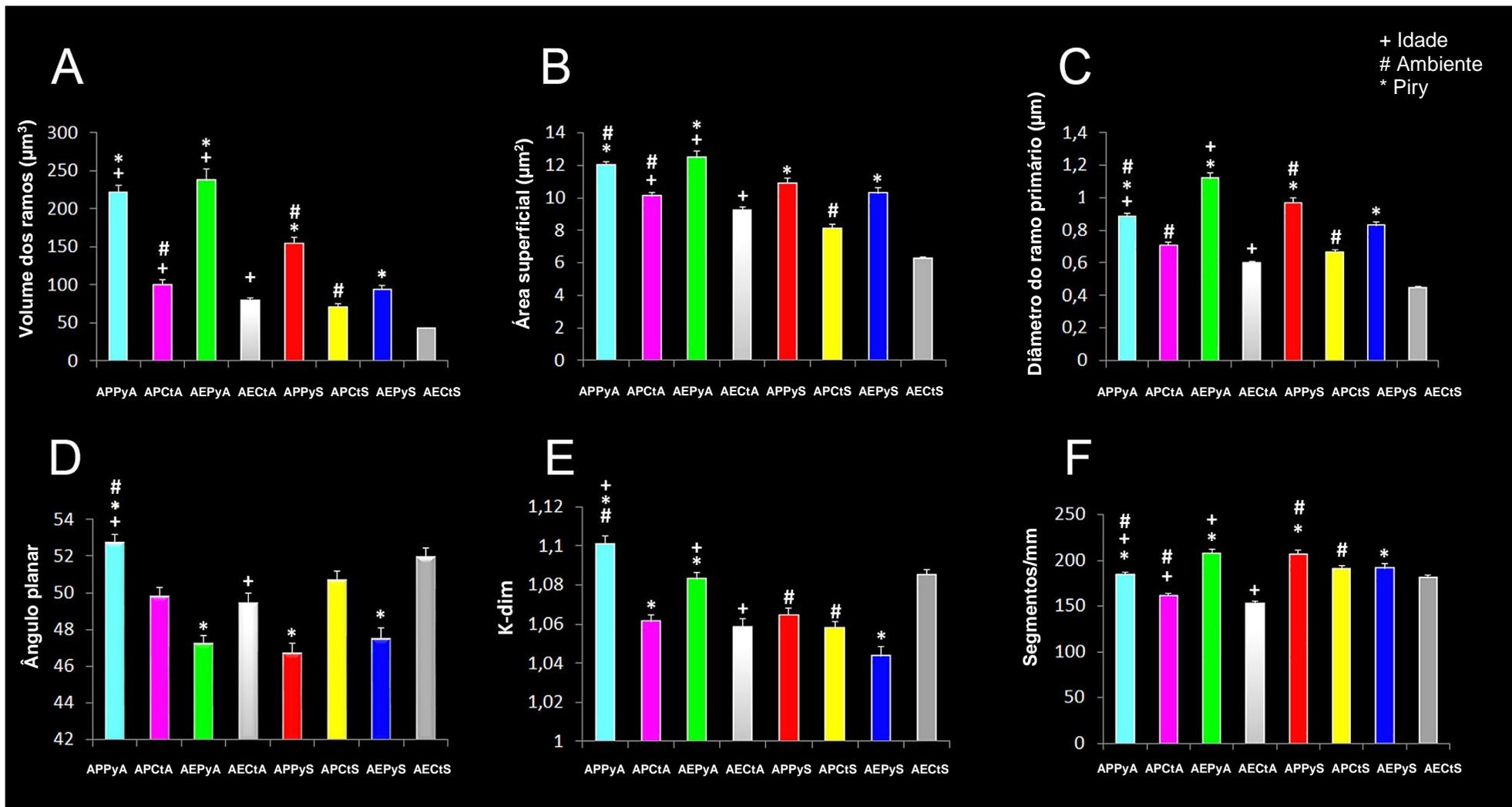




Figura 28: Gráficos representativos dos parâmetros morfométricos relacionados aos ramos e ao soma das micróglia reconstruídas tridimensionalmente (cont.). Representações gráficas dos parâmetros morfométricos que mais contribuíram para distinguir os grupos experimentais (cont.). + Idade; # Ambiente; * Piry.

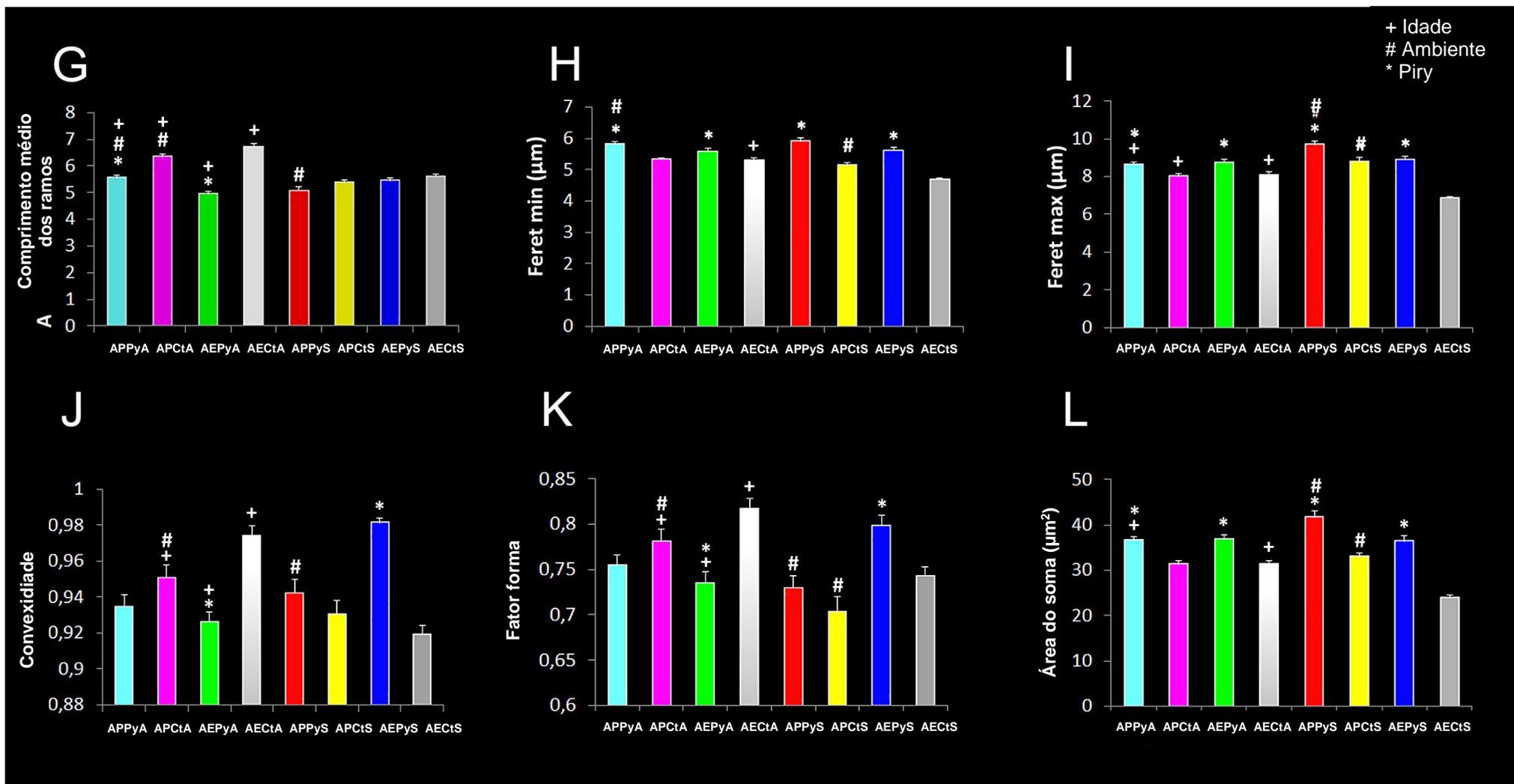




Tabela 7. Fatores morfológicos microgliais dos animais adultos (A) e senis (S) infectados (Py). APPyA = camundongo adulto de ambiente padrão infectado, APCtA = camundongo adulto de ambiente padrão controle, AEPyA = camundongo adulto de ambiente enriquecido infectado, AECtA = camundongo adulto de ambiente enriquecido controle, APPyS = camundongo senil de ambiente padrão infectado, APCtS = camundongo senil de ambiente padrão controle, AEPyS = camundongo senil de ambiente enriquecido infectado, AECtS = camundongo senil de ambiente enriquecido controle. Média \pm s.e.m. de cada característica morfológica da microglia para cada grupo experimental (em cima) e os valores de p, ANOVA três critérios, comparações pareadas (em baixo).

Grupos	Volume total	Volume dos ramos	Área superficial	Diâmetro da base primária	Segmentos/mm	Nº de segmentos	Perímetro do soma	Feret min	Feret máx
APPyA	4479,323	221,3775	12,0073	0,8853	183,974	94,74	24,8475	5,83	8,64
	$\pm 581,19$	$\pm 9,4732$	$\pm 0,2445$	$\pm 0,0164$	$\pm 2,9183$	$\pm 3,2367$	$\pm 0,3260$	$\pm 0,0761$	$\pm 0,1419$
APCtA	2001,225	100,0612	10,1121	0,7091	161,154	61,50	22,5425	5,32	8,01
	$\pm 313,89$	$\pm 6,1811$	$\pm 0,2323$	$\pm 0,01697$	$\pm 2,8735$	$\pm 1,9352$	$\pm 0,3123$	$\pm 0,0689$	$\pm 0,1671$
AEPyA	5439,154	237,5328	12,4749	1,1188	207,835	76,36	25,1075	5,58	8,75
	$\pm 677,34$	$\pm 14,0211$	$\pm 0,3964$	$\pm 0,0329$	$\pm 3,8684$	$\pm 2,2703$	$\pm 0,4091$	$\pm 0,1033$	$\pm 0,1641$
AECtA	1632,415	78,7174	9,2317	0,5973	152,789	63,45	22,0075	5,30	8,05
	$\pm 182,31$	$\pm 4,1014$	$\pm 0,2143$	$\pm 0,0127$	$\pm 2,7955$	$\pm 2,2475$	$\pm 0,3608$	$\pm 0,0771$	$\pm 0,1821$
APPyS	3136,240	154,3657	10,8960	0,9680	206,446	69,13	26,75125	5,91	9,69
	$\pm 407,56$	$\pm 7,6260$	$\pm 0,3264$	$\pm 0,0289$	$\pm 4,7889$	$\pm 3,0539$	$\pm 0,4875$	$\pm 0,1232$	$\pm 0,2162$
APCtS	1384,748	70,7574	8,1352	0,6646	190,662	59,41	24,62375	5,14	8,81
	$\pm 181,11$	$\pm 3,6654$	$\pm 0,2328$	$\pm 0,0178$	$\pm 3,1732$	$\pm 2,0956$	$\pm 0,4561$	$\pm 0,0856$	$\pm 0,1949$
AEPyS	2503,910	93,5745	10,2863	0,8297	191,446	51,26	23,87125	5,61	8,91
	$\pm 234,29$	$\pm 4,9104$	$\pm 0,3219$	$\pm 0,0216$	$\pm 4,4074$	$\pm 2,1916$	$\pm 0,4185$	$\pm 0,1071$	$\pm 0,1835$
AECtS	1161,750	42,2354	6,2476	0,4462	180,968	69,15	20,1225	4,68	6,84
	$\pm 24,95$	$\pm 1,3420$	$\pm 0,1133$	$\pm 0,0056$	$\pm 2,5547$	$\pm 1,8536$	$\pm 0,2684$	$\pm 0,0707$	$\pm 0,1077$



ANOVA três critérios pairwise comparisons (p-values)

<i>Comparações pareadas</i>	Volume total	Volume dos ramos	Área superficial	Diâmetro da base primária	Segmentos/m	Nº de segmentos	Perímetro do soma	Feret min	Feret máx
APPyA x APcTA	p< 0.0095	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0042
APPyA x APPyS	ns	p< 0.0001	p< 0.0072	p< 0.0139	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0014	ns	p< 0.0001
APPyA x AEPyA	ns	ns	ns	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	ns	p< 0.0521	ns
APcTA x APcTS	ns	p< 0.0001	p< 0.0001	ns	p< 0.0001	ns	p< 0.0002	ns	p< 0.0021
APcTA x AECtA	ns	p< 0.0046	p< 0.0060	p< 0.0001	p< 0.0385	ns	ns	ns	ns
APPyA x APcTS	p< 0.0077	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0067	p< 0.0096	p< 0.0017	p< 0.0001	p< 0.0031
APPyA x AEPyS	ns	p< 0.0001	ns	p< 0.0002	p< 0.0225	p< 0.0001	p< 0.0001	ns	p< 0.0066
APcTS x AECtS	ns	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0185	p< 0.0006	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001
AEPyA x AECtA	p< 0.0016	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0337	p< 0.0051
AEPyA x AEPyS	p< 0.0064	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0058	p< 0.0001	p< 0.0362	ns	ns
AECtA x AECtS	p< 0.0430	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0522	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001
AEPyS x AECtS	p< 0.0013	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0413	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001	p< 0.0001



3.7 Micróglia médias de cada grupo experimental: Reconstrução tridimensional.

Todas as reconstruções foram realizadas em animais na janela temporal de 8DPI. A partir das reconstruções tridimensionais de todos os grupos experimentais (Adulto e Senil), retiramos a célula média que representa cada um desses grupos e um quadro comparativo, entre animais jovens e velhos, com a fotomicrografia, a reconstrução 3D e o dendograma, foi montado para os animais de Ambiente Enriquecido (Figura 29) e de Ambiente Padrão (Figura 30).

3.8 Análise de conglomerados e Análise Discriminante

As análises de conglomerados (Cluster) e de Discriminante (Figura 31) de todos os grupos experimentais sugeriram a ocorrência de três grupos distintos de micróglia. Com apenas uma única exceção o animal APCtA1 (IY1), os dois clusters do lado direito (linhas vermelhas) contêm apenas indivíduos infectados e a maioria dos indivíduos no cluster da esquerda representam a amostra microglial dos indivíduos controle. No entanto, três de quatro camundongos senis infectados do AE, e um em cada quatro de ambiente empobrecido, estão agrupados em conjunto com os grupos de controle (Figura 31A), sugerindo que as mudanças da microglia após a infecção nos indivíduos senis foram menos significativas. A Figura 31B é uma representação gráfica da análise discriminante. Esta análise revelou que o volume total ($p < 1 \times 10^{-6}$), a densidade de segmentos ($p = 0,021$), a área da superfície ($p = 0,027$) e o número total de segmentos ($p = 0,0069$) foram as características morfométricas que mais contribuíram para a formação de aglomerados (Tabela 8). Os resultados sugerem que a nossa amostra foi composta por três classes principais de microglia, distinguidas pelas distâncias euclidianas acima de 3000. Dois destes grupos de micróglia, correspondeu aos animais infectados e a outra correspondeu a microglia dos camundongos controle e infectados senis de ambiente enriquecido. No entanto, se optarmos por distâncias euclidianas acima de 1000, como ponto de referência para analisar a formação dos grupos (ver linha verde na Figura 31B), encontraremos cinco grupos diferentes de micróglia, três dos quais correspondente a camundongos infectados, e os outros dois

correspondem aos grupos controle, os indivíduos do do grupo de ambiente enriquecido infectado senil (AEPyS) não foram significativamente diferentes de seu respectivo controle (AECtS).

Figura 29 - Ilustrações mostrando as células médias dos grupos experimentais de Ambiente Enriquecido reconstruídas tridimensionalmente. Fotomicrografias, reconstruções tri-dimensionais e dendrograma linear das micróglias médias de cada grupos experimental de AE. Os ramos individuais são coloridos diferentemente para facilitar o exame.

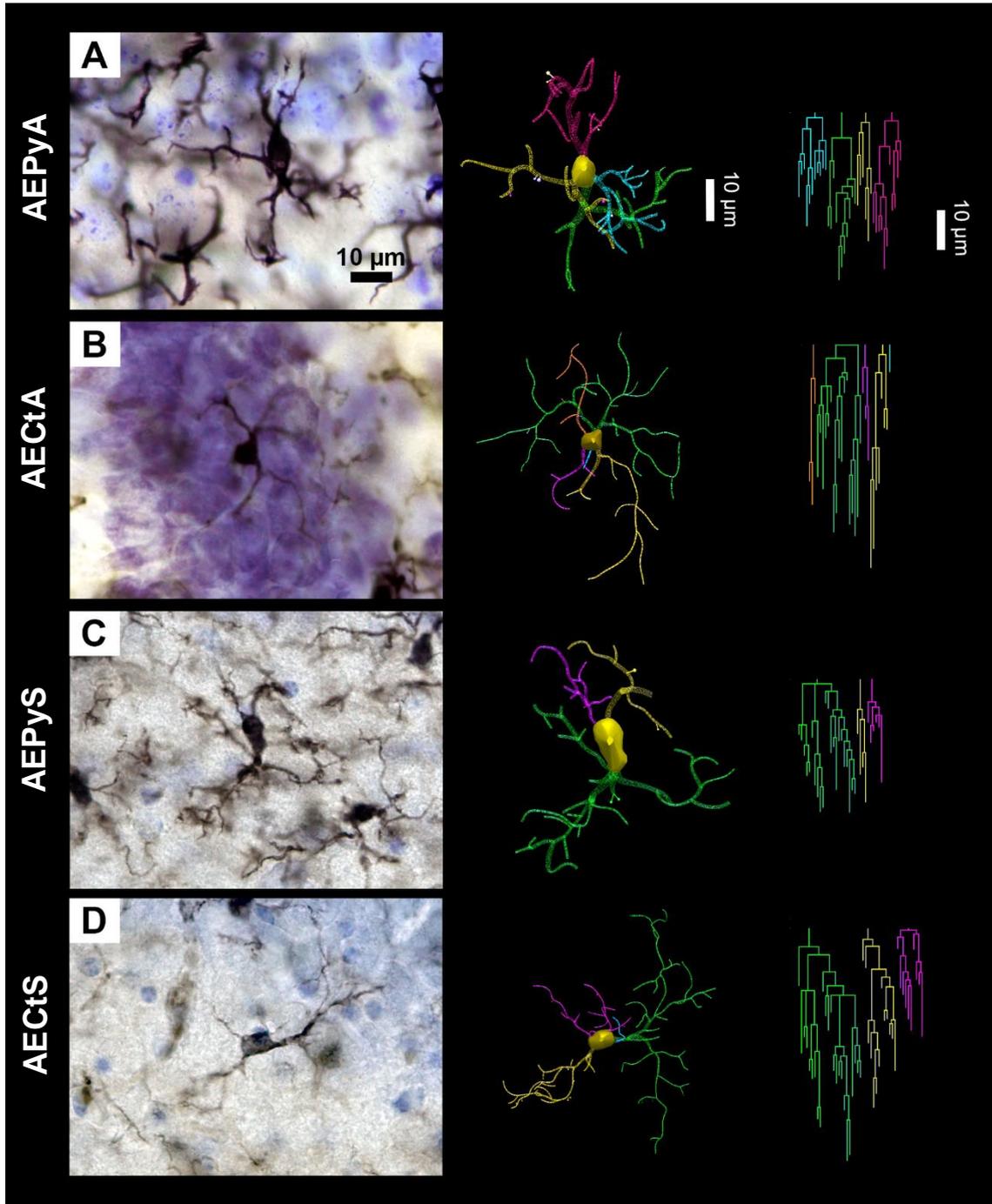


Figura 30 - Ilustrações mostrando as células médias dos grupos experimentais de Ambiente Padrão reconstruídas tridimensionalmente. Fotomicrografias, reconstruções tri-dimensionais e dendrograma linear das micróglia médias de cada grupos experimental de AE. Os ramos individuais são coloridos diferentemente para facilitar o exame.

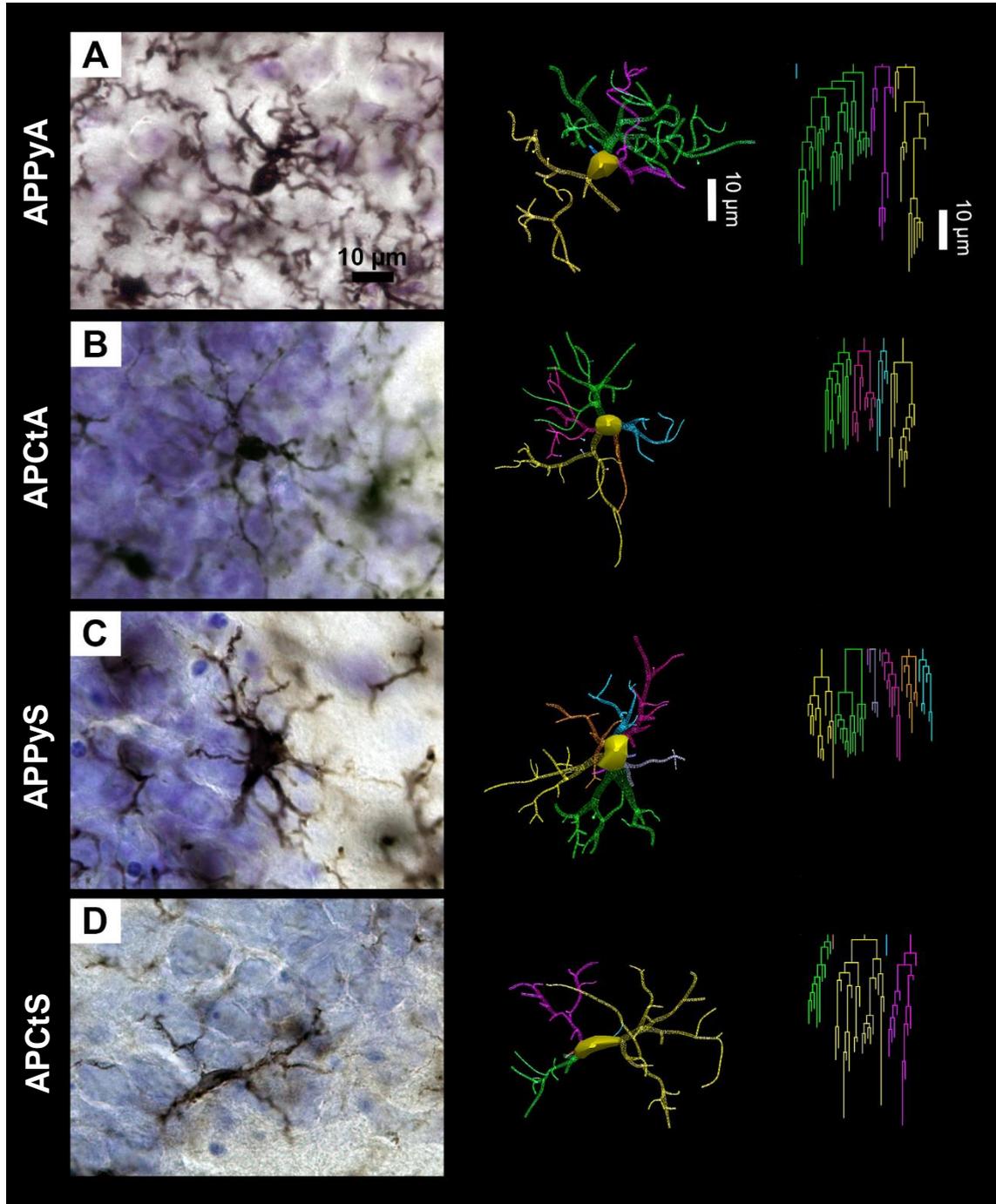
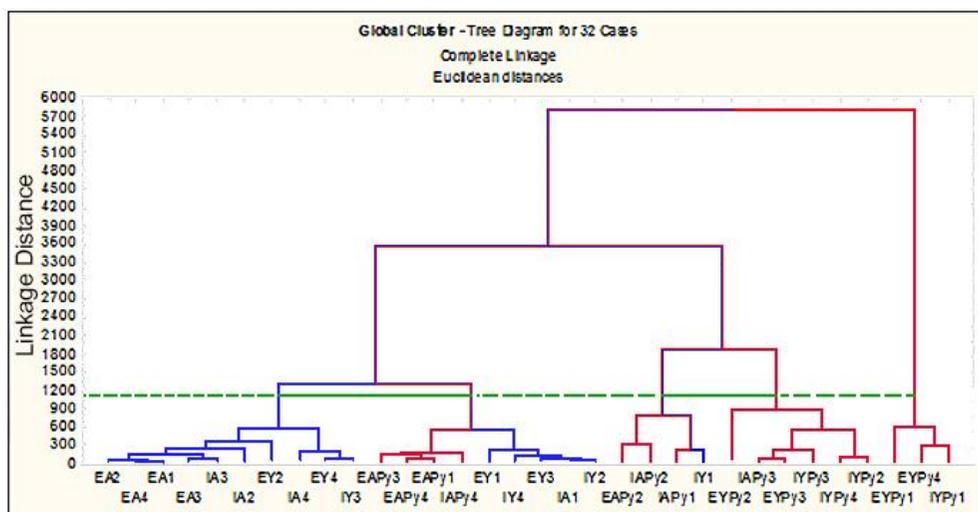




Figura 31. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia (A) e Análise discriminante (B) para ilustrar a distinção entre os grupos de micróglia de CA3. Em A nota-se a ocorrência de três grupos distintos de micróglia. Com apenas uma única exceção para animais APCTa1 (IY1), os dois clusters do lado direito (linhas vermelhas) contêm apenas indivíduos infectados e a maioria dos indivíduos no cluster da esquerda representam a amostra microglial dos indivíduos controle. No entanto, três de quatro camundongos senis infectados do AE, e um em cada quatro de ambiente empobrecido, estão agrupados em conjunto com os grupos de controle (A). Em B Esta análise revelou que o volume total ($p < 1 \times 10^{-6}$), a densidade de segmentos ($p = 0,021$), a área da superfície ($p = 0,027$) e o número total de segmentos ($p = 0,0069$) foram as características morfométricas que mais contribuíram para a formação de aglomerados.

A Análise de conglomerados (Cluster)



B Análise Discriminante

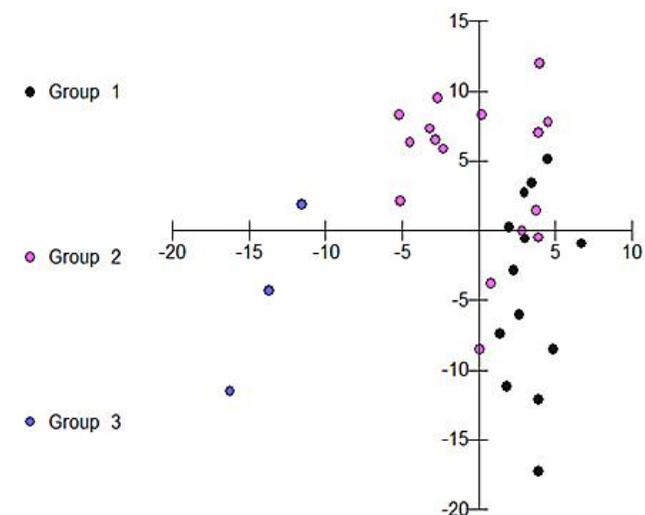




Tabela 8. Parâmetros utilizados para a análise de conglomerados, mostrando os quatro critérios que mais contribuíram para a formação dos grupos.

Parâmetro morfométrico	Wilks' lambda	Partial Lambda	F-remove (2,22)	p-value	Toler.	1-Toler (R-Sqr.)
Volume total	0.157985	0.199902	44.02711	0.000000	0.503532	0.496468
Segmentos/mm	0.044805	0.704862	4.60588	0.021338	0.169432	0.830568
Área superficial (µm²)	0.043829	0.720557	4.26598	0.027186	0.042287	0.957713
Número de segmentos	0.049614	0.636547	6.28075	0.006952	0.099428	0.900572
K-dim	0.041061	0.769132	3.30184	0.055720	0.138745	0.861255
Solidity	0.034407	0.917866	0.98432	0.389560	0.510534	0.489466
Volume dos ramos (µm ³)	0.037310	0.846455	1.99538	0.159824	0.082681	0.917319
Área (µm ²)	0.035668	0.885441	1.42319	0.262273	0.130400	0.869600



4. DISCUSSÃO

Utilizando o vírus Piry como modelo para estudar os resultados da encefalite em camundongos suíços albinos fêmeas alojados em condições de AE ou AP, induzimos previamente a encefalite viral pela inoculação intranasal de homogenado cerebral infectado pelo vírus Piry e correlacionamos os fatores neuropatológicos que foram quantificados pelo uso do método imparcial baseado na estereologia com a mudanças comportamentais, comparando os resultados desses animais inoculados com animais inoculados com homogenado de cérebro normal (DE SOUSA, *et al.*, 2011, p. 15597). No presente trabalho, ampliamos essa investigação aos animais senis, para testar a hipótese de que a intensidade das mudanças microgliais poderiam estar associadas com déficits comportamentais mais severos. Para tal, utilizou-se a reconstrução tri-dimensional e a análise estatística multivariada. Descobrimos que camundongos senis infectados, independentemente do ambiente no qual foram alojados, reduzem, permanentemente a atividade de Burrowing, transitoriamente a discriminação olfatória e a atividade exploratória e locomotora no campo aberto.

Efeitos do Enriquecimento Ambiental

A exposição de animais de laboratório a um ambiente repleto de estímulos somatomotores, visuomotores, sociais e cognitivos tem sido muito utilizado na literatura, sendo estes estudados desde 1960 (BENNETT *et al.*, 1969, p.35), principalmente pelos seus efeitos cognitivos benéficos em animais doentes (VAN PRAAG *et al.*, 2000, p. 102). Sendo assim, o enriquecimento ambiental foi utilizado neste trabalho com o intuito de verificar os seus efeitos sobre a progressão da encefalite provocada pelo vírus Piry e o quão benéfico ou neuroprotetor no ponto de vista comportamental e neuropatológico.

O enriquecimento ambiental consiste em aumentar a complexidade do ambiente de alojamento do animal com a finalidade de promover o seu bem-estar, ao tentar imitar o seu ambiente natural, e como consequência, provoca diversos efeitos em seu comportamento (BAYNE, 2005, p.2). É baseado em três eixos: o primeiro diz respeito ao tamanho da área habitável que deve ser maior para comportar os objetos físicos que “enriquecem” o meio, como brinquedos, túneis e



rodas de corrida com a finalidade de promover a experiência sensorial e motora aos animais. O segundo eixo, diz respeito ao tempo dos objetos dentro do ambiente, pois eles devem ser trocados regularmente, de modo a manter os animais sempre curiosos, para manter a exploração voluntária elevada. O terceiro eixo, está baseado na interação social, onde os animais são alojados em grupos (HIRASE; SHINOHARA, 2014, p.306). No presente trabalho, todos os eixos relacionados com o enriquecimento ambiental e descritos acima foram obedecidos.

Na literatura, os efeitos benéficos sobre a cognição promovidos pelo AE, já estão bem estabelecidos, e por esta razão, ganhou uma atenção crescente na última década (PANG; HANNAN, 2013, p.515), mostrando ter participação positiva em infecções virais (SOUSA *et al.*, 2011, p.e15597) e em diversas patologias neurológicas, incluindo a doença de Alzheimer, Huntington, síndrome de Rett e acidente vascular cerebral (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006, p.697; PANG; HANNAN, 2013, p.515), neste trabalho também se observou os benefícios do enriquecimento ambiental em animais jovens e senis submetidos à infecção viral pelo arbovírus Piry, onde os efeitos da encefalite viral foram amenizados em animais vindos de ambiente enriquecido, independentemente da idade.

Déficits Comportamentais

Foram analisadas e comparadas as alterações comportamentais induzidas pela encefalite provocada pelo arbovírus Piry através da inoculação intranasal de homogenado cerebral infectado em camundongos Suíços albinos. Essas mudanças foram mensuradas através da análise do comportamento nos testes de remoção e estocagem de comida (Burrowing), campo aberto e discriminação olfatória, que parecem ser alterados após danos hipocâmpais (DEACON *et al.*, 2001, BANNERMAN *et al.*, 2003, CUNNINGHAM, 2005).

O teste de Burrowing é um teste simples que pode avaliar uma série de alterações no comportamento espontâneo de roedores (DEACON *et al.*, 2001, p.2053). É baseado no comportamento espécie-específico de roedores, através da utilização de um tubo que imita as circunstâncias do ambiente natural do roedor (SCHMID *et al.*, 2001, p.53). É um teste altamente sensível na detecção de danos hipocâmpais e na avaliação da progressão de doenças neurodegenerativas,



infecções virais ou bacterianas (JIRKOF, 2014, p.139) Animais jovens e senis, expostos à infecções bacterianas ou virais, apresentam déficits na performance do burrowing (HART *et al.*, 2012, p.754; McLINDEN *et al.*, 2012, p.1219), como mostrado, também, no presente trabalho.

Diversos estudos mostram que o Burrowing é uma ferramenta não invasiva e promissora para avaliar o comportamento doentio, incluindo inflamações, onde a performance é diminuída (JIRKOF, 2014, p.139), sendo considerado um sinal precoce da progressão da doença (CUNNINGHAM *et al.*, 2003, p.2147; CUNNINGHAM *et al.*, 2005, p.258; DEACON *et al.*, 2001, p.2053; DEACON *et al.*, 2005, p.99; FELTON *et al.*, 2005, p.283; GUENTHER *et al.*, 2001, p.401). Similarmente, alterações virais sistêmicas induzidas pela inoculação intranasal do vírus Piry, diminuem as taxas de burrowing em animais jovens por até 2 dias (DE SOUSA *et al.*, 2011, p.e15597; CUNNINGHAM *et al.*, 2007, p.490; KONAT *et al.*, 2009, p.1381). Neste trabalho, observou-se o início da diminuição do burrowing exatamente durante o pico da infecção (7 e 8DPI) em todos os grupos (adulto e senil), com exceção do grupo AEPy adulto que não apresentou nenhuma alteração significativa. Os animais adultos (APPy) se reestabeleceram aos 10DPI, enquanto que nos animais senis, não houve recuperação, sendo os danos permanentes. Tanto infecções bacterianas quanto virais, tem efeitos deletéricos no burrowing em animais senis quando comparados com animais jovens (HART *et al.*, 2012, p.754; McLINDEN *et al.*, 2012, p.1219) corroborando os achados neste trabalho, onde animais senis inoculados intranasalmente pelo vírus Piry diminuem as taxas de burrowing a partir do pico da doença (7-8DPI) até o final do experimento (40DPI). Estes resultados seguem a mesma linha de resultados anteriores, demonstrando que uma inflamação sistêmica induzida pelo LPS para imitar a resposta inflamatória à infecção (TEELING *et al.*, 2007, p.836) ou Poly:IC, um receptor 3 toll-like agonista, imitando respostas inflamatórias à infecções virais (KONAT *et al.*, 2009, p.1381) reduzem a atividade de Burrowing. Como a atividade de Burrowing requer integridade hipocampal e as regiões do hipocampo ventral, giro denteado e septo foram alvo de vírus Piry, sugerimos que um dano permanente nessas áreas possa ter contribuído, pelo menos em parte, para a redução na quantidade de ração estocada nos camundongos senis infectados.

Em animais jovens infectados pelo vírus Piry, o enriquecimento ambiental funciona como um agente neuroprotetor, não deixando com que a atividade



locomotora, no teste de Campo Aberto, desses animais decaía, porém em animais de AP, as taxas da atividade locomotora caem aos 20DPI, permanecendo assim até os 40DPI (DE SOUSA, *et al.*, 2011, p. e15597). Os animais senis, estudados neste trabalho, apresentam alterações semelhantes aos animais jovens nesse teste, onde os animais de AE não sofrem alterações comportamentais enquanto que os de AP alteram o comportamento aos 20DPI, mas se reestabelecem aos 40DPI.

Em contraste a atividade de Burrowing, a atividade exploratória e motora, avaliada pelo teste de campo aberto, apareceu transitoriamente alterada mais tarde na doença (20DPI) em ambos, adultos (DE SOUSA *et al.*, 2011, p. 15597) e em camundongos senis, mas manteve-se assim até os 40DPI apenas nos animais adultos do grupo APPy. Nenhuma diferença significativa foi observada em animais adultos e senis do AEPy. Assim como em nossos resultados, a injeção sistêmica de LPS para mimetizar a infecção bacteriana, reduziu a atividade no campo aberto em camundongos criados em ambiente empobrecido das gaiolas padrão de laboratório (TEELING *et al.*, 2007, p.836).

Mudanças morfológicas microgliais e envelhecimento

As micróglia são células imunes do SNC que possuem um papel importante na homeostase do organismo durante o desenvolvimento, na fase adulta e no envelhecimento, sendo controladas rigidamente, pelas condições do microambiente cerebral, onde distúrbios, tais como neurodegeneração e envelhecimento, podem causar profundas consequências na função e no fenótipo da micróglia (PERRY; TEELING, 2013, p.601). Neste trabalho, foram utilizados animais adultos e senis com encefalite induzida pela infecção por arbovírus, e observou-se alterações morfológicas nas micróglia no decorrer do curso da infecção.

A ativação da micróglia residente, é um fator intrínseco na defesa imunológica inata do SNC, sendo considerado como um fenômeno que marca o início da neuropatologia, simplesmente atuando como uma célula de “limpeza” (SCHWAB; SCHLUESNER, 2004, p.1245). Mudanças morfológicas microgliais no camundongo senil foram menos intensas do que em animais adultos indicando que a resposta inflamatória reduzida em indivíduos senescentes pode agravar os resultados da encefalite. Tanto em animais jovens quanto senis, a ativação microglial máxima é atingida juntamente com o pico da infecção viral (7-8DPI), porém as

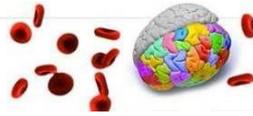


mudanças no perfil das micróglia começam anteriormente, evoluindo no decorrer da infecção.

Nossos resultados anteriores usando vírus Piry como um modelo para induzir a encefalite em camundongos suíços fêmeas adultos revelaram que a resposta microglial no hospedeiro é mais intensa e generalizada no parênquima cerebral aos 8DPI em comparação com 20 ou 40DPI (DE SOUSA, *et al.*, 2011, p.15597). Estes resultados anteriores sugerem que a ativação da microglia pode ser um dos fatores-chave na patogênese da encefalite pelo vírus Piry. No presente relatório, comparamos as sutilezas das alterações morfológicas microgliais do camundongo adulto e senil infectados pelo Piry aos 8DPI, usando a reconstrução tridimensional em associação com correspondentes deficiências comportamentais, e encontramos uma associação inversa entre a idade, deficiências comportamentais e a resposta microglial do hospedeiro. De fato, as mudanças microgliais em camundongos adultos eram muito mais intensas do que em camundongos idosos, enquanto que as mudanças comportamentais foram mais severas em animais senescentes. Embora a evidência, no presente trabalho, seja indireta e de correlação, levanta a oportunidade e fornecer hipóteses sobre as relações entre as mudanças morfológicas da micróglia, infecções virais citopáticas e déficits comportamentais. Além disso, este modelo forma-função microglial fornece um bom ponto de partida para o estudo da resposta inflamatória microglial do hospedeiro à infecção viral sob a influência de ambientes distintos que imitam os estilos de vida sedentário (ambiente padrão) e ativo (ambiente enriquecido).

Reconstrução Tri-dimensional das micróglia após a infecção viral

Poucos trabalhos utilizam a reconstrução tridimensional microscópica da micróglia para descrever suas mudanças sob condições homeostáticas e neuropatológicas (PAPAGEORGIU, *et al.*, 2014; TORRES-PLATAS *et al.*, 2014, p.12), mas nenhum deles dedicou-se a quantificar as mudanças microgliais no cérebro de camundongos adultos e senis, sob ataque de um arbovírus. Como resultado, as associações quantitativas e a morfologia tri-dimensional e as mudanças comportamentais em modelos murinos de encefalite, não estão firmemente estabelecidas.



Combinando a amostragem aleatória sistemática para garantir que todas as regiões da CA3 tenham a mesma probabilidade de contribuir para a amostra, e análise estatística multivariada, demonstramos que a gravidade das deficiências comportamentais não foi diretamente correlacionada com a intensidade das alterações morfológicas das micróglia na região escolhida. Também demonstramos que as alterações comportamentais e morfológicas da micróglia associadas à encefalite pelo vírus Piry, foram mais intensas em animais alojados em condições de AP em comparação com os resultados da encefalite em animais de AE, e que as mudanças morfológicas microgliais foram mais graves em animais adultos do que em animais envelhecidos.

No presente trabalho, utilizamos cortes parassagitais (70 μ m) do cérebro do camundongo suíço albino que foram marcadas histoquimicamente pelo IBA-1, o qual marca células microgliais e macrófagos (ITO *et al.*, 1998, p.1). Fatores morfológicos, tais como o tamanho do corpo celular e comprimento dos ramos, foram medidos. As micróglia foram selecionados da região de CA3 dorsal de forma sistemática e aleatória, com a finalidade de gerar suas medidas morfométrica e a sua reconstrução 3D.

As micróglia, ao longe de sua ativação, sofrem uma série de alterações em suas escalas métricas (por exemplo: tamanho do soma, diâmetro da ramificação, tortuosidade, etc.), as quais geram um grande desafio para os métodos tradicionais de medição, que necessitam tornar-se mais quantitativos (KARPERIEN *et al.*, 2013, p.1). Um método que pode contribuir para minimizar essa necessidade é a análise fractal, que consiste em um grupo de métodos que quantificam padrões difíceis de descrever. Embora se tenha poucos trabalhos envolvendo a análise fractal, esse método é inovador e preciso na medição complementar de parâmetros morfológicos de células, tais como a micróglia (KARPERIEN, 2001a; MARCANDI *et al.*, 2008, p.12; KAM *et al.*, 2008, p.130; SAN; FAIRGRIEVE, 2012, p.610; SCHNEIDER *et al.*, 2012, p.671), pois permite a identificação de formas intermediárias de ativação dessa célula (KARPERIEN *et al.*, 2013). Essa técnica é bem estabelecida em neurociências e é uma ferramenta chave na quantificação de modelos que avaliam a forma e a função microglial, sendo assim utilizado ao longo deste trabalho.



São vários os parâmetros morfométricos envolvidos na reconstrução 3D, dentre eles podemos citar: área do soma, feret máximo e mínimo, tortuosidade, área superficial, diâmetro do ramo primário e etc. Em animais jovens e envelhecidos submetidos à infecção viral, e alojados em ambientes distintos (ambiente enriquecido e ambiente padrão), apresentam modificações microgliais distintas na fase aguda da encefalite. Animais senis apresentam área do soma, volume dos ramos e diâmetro do ramo primário maiores quando comparados com animais jovens (VIANA, *et al.*, 2013, p.280), corroborando, em partes, os resultados deste trabalho, onde os animais que pertencem em AE infectados (AEPy) não apresentam qualquer alteração na área do soma quando comparados com os animais jovens do mesmo ambiente. Sendo assim, o enriquecimento ambiental promove neuroproteção ao cérebro acometido pela encefalite pelo arbovirus Piry, tanto em animais jovens quanto senis.

Limitações técnicas

No presente trabalho através da análise estatística multivariada dos parâmetros morfométricos das micróglia, revelamos no mínimo três e, possivelmente, cinco grupos morfolologicamente distintos de microglia na região de CA3 dorsal em camundongos jovens e idosos, infectados e não infectados. Dois desses tipos foram encontrados nos grupos controle e os outros três nos indivíduos infectados. Reconstruções microscópicas 3D podem ser afetadas por fatores mecânicos associados ao seccionamento no vibratomo e ao procedimento de desidratação, os quais podem induzir retração não uniforme nas secções no eixo z (HOSSEINI-SHARIFABAD; NYENGAARD, 2007, p.206). Assim, as estimativas das modificações nas dimensões no eixo x/z durante o processamento do tecido podem não ser extrapoladas linearmente para dimensão z. Essas limitações metodológicas impostas devem ser levadas em consideração na interpretação dos dados, no presente estudo. No entanto, deve-se enfatizar que um indicador confiável da retração severa no eixo z é a ondulação de ramos, o que significa que os processos individuais não encolhem na mesma velocidade que a fatia nos quais estão localizados. Estes efeitos podem ter amplitude mais elevada na superfície, diminuindo a profundidade no eixo z. Este padrão, no entanto, não foi observada nas microglia selecionadas para serem reconstruídas neste estudo e a amostra foi feita na região do meio do eixo z, onde o impacto destas



mudanças são pequenas. Mais recentemente, tem sido demonstrado que, no eixo dos z (perpendicular à superfície de corte), as secções retraem aproximadamente 25% da espessura do corte após desidratação (CARLO; STEVENS, 2011, p.2803). Com base nesses achados todas as reconstruções das micróglia, do presente relatório, foram corrigidas para a retração do eixo z em 75%. Nenhuma correção foi aplicada para os eixos x/y, os quais não mudaram após a desidratação histológica e imunomarcção.

Outra limitação é relatada ao fato de não existirem procedimentos estereológicos que foram realizadas para estimar o número total de cada tipo de micróglia na área alvo em camundongos envelhecidos. No entanto, pelo fato dos critérios para a seleção das micróglia a serem reconstruídas tridimensionalmente foram feitas de forma sistemática, as cegas e aleatóreamente em todos os sujeitos, bem como o número de elementos selecionados para reconstrução ser grande (640 no total, 80 micróglia de cada grupo), é razoável supor, que não há, *a priori*, um viés amostral induzido pela escolha dos objetos de interesse entre os indivíduos.

Os mecanismos de proteção neuronal que são ativados durante o maior clearance viral nos cérebros dos animais de AE ainda precisam ser esclarecidos. A análise celular e molecular detalhada construída sobre essas observações, incluindo a caracterização das células inflamatórias mobilizadas para o parênquima, bem como a neuroinvasão viral e os mecanismos de eliminação do vírus, podem delinear a base patofisiological desses eventos, melhorando nossa compreensão do tratamento não-farmacológico de doenças neurológicas.



5. CONCLUSÕES

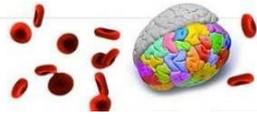
- 1) A encefalite induzida pelo vírus Piry provocou perda permanente no reconhecimento olfativo em camundongos senis de AE e AP, enquanto que em camundongos adultos, essas perdas foram transitórias em AE e permanentes no AP.
- 2) A atividade de Burrowing foi afetada permanentemente em animais senis infectados de AP e de AE, porém afetou transitoria e exclusivamente os animais adultos de AP.
- 3) Déficits na atividade locomotora durante o teste de campo aberto apareceram mais tarde na doença e foram limitados a camundongos adultos criados em ambiente pobre. Em camundongos senis do AP esses déficits também aparecem mais tarde, mas transitoriamente.
- 4) Mudanças microgliais foram significativamente mais severas em animais adultos do que em animais senis.
- 5) Em comparação com a microglia de todos os outros grupos, os camundongos adultos infectados do ambiente empobrecido, mostraram ter um grau significativamente maior de expansão do volume das árvores, área superficial, espessamento do diâmetro da base do ramo, e alargamento do soma celular.

A gravidade das alterações morfológicas microgliais em camundongos envelhecidos não mostrou correlações diretas com déficits comportamentais permanentes ou mortes, sugerindo que as alterações da microglia, isoladamente, pode não explicar os danos ao SNC induzidos pela encefalite causada pelo vírus Piry em camundongos senis.



REFERÊNCIAS

- ACSÁDY, L. et al. **GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus.** The Journal of neuroscience, v. 18, n. 9, p. 3386-3403. 1998.
- AJAMI, B. et al. **Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.** Nat. Neurosci. 10, 1538–1543. 2007.
- ALLIOT, F.; GODIN, I.; PESSAC, B. **Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain.** Brain Res. Dev. Brain Res. 117, 145–152. 1999.
- ARAÚJO, R.; ARAÚJO, M.T.M.F; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. **Alterações ultra-estruturais na infecção experimental com arbovírus na Amazônia.** Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública 1: 451-465. 1986.
- ARRANZ, L. et al. **Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice.** Rejuvenation Res. Aug;13(4):415-28. 2010.
- ASANO, Y. **Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats.** Jikken Dobutsu 35(4): 505-8. 1986.
- BABIC, N. et al. **Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation.** Virology. Nov 1;204(2):616-25. 1994.
- BAYNE, K. **Potential for Unintended Consequences of Environmental Enrichment for Laboratory Animals and Research Results.** Volume 46, Number 2. 2005.
- BANNERMAN, D.M. et al. **Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning.** Behav Brain Res 139:197-213. 2003.
- BANNERMAN, D.M., et al. **Medial septal lesions mimic effects of both selective dorsal and ventral hippocampal lesions.** Behav Neurosci. Oct;118(5):1033-41. 2004.
- BANNERMAN, D.M. et al. **Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety.** Neurosci Biobehav Rev 28(3): 273-83. 2004b.



BELZUNG, C.G. **Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review.** Behav Brain Res 125: 141-9. 2001.

BERAN, G.W. **The handbook of zoonoses.** CRC press 2.ed.: 220-221. 1994.

BERGE, T.O. **International catalogue of arboviruses.** Washington, D. C., US 2nd. ed. 1994. 75-8031. 1975.

BERGOLD, G.H.; MUNIZ, K. **Characterization of Piry virus.** Arch. Gesamte. Virusforsch 31(1): 152-67. 1970.

BLASCKSTAD, T.W. **Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination.** J Comp Neurol 105(3): 417-537. 1956.

BLOMBER, B.B.; FRASCA, D. **Age effects on mouse and human B cells.** Immunol Res. Dec;57(1-3):354-60. 2013.

BRIEN, J.D. et al. **Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus.** J Exp Med. Nov 23; 206(12):2735-45. Epub 2009 Nov 9. 2009.

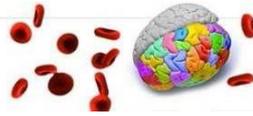
BROWN, J. et al. **Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis.** European Journal of Neuroscience 17: 2042-2046. 2003.

CAJAL, S. R. **Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano.** Trab Lab Investig Biol 11: 255-315. 1913.

CARD, J.P. et al. **Differential tropism of pseudorabies virus for sensory neurons in the cat.** J. Neurovirol 3: 49-61. 1997.

CARD, J.P.; LEVITT, P.; ENQUIST, L.W. **Different patterns of neuronal infection after intracerebral injection of two strains of pseudorabies virus.** J. Virol 72: 4434-44. 1998.

CARD, J.P.; ENQUIST, L.W.; MOORE, R.Y. **Neuroinvasiveness of pseudorabies virus injected intracerebrally is dependent on viral concentration and terminal field density.** J. Comp. Neurol 407: 438-452. 1999.



CARLO, C; STEVENS, C. **Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology.** Journal of Comparative Neurology, v. 519, n. 14, p. 2803-2810, 2011.

CAROLA, V. et al. **Evaluation of the elevated plus-maze and open field test for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice.** Behav. Brain Res. 134: 49-57. 2002.

CARR, W.J. et al. **Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats.** J Comp Physiol Psychol 90:821-828. 1976.

CASTELO-BRANCO, C.; SOVERAL, I. **Phytoestrogens and bone health at different reproductive stages.** Gynecol Endocrinol. Aug;29(8):735-43. Epub 2013 Jun 6. 2013.

CHARLES, P.C.; WARGOLIS, F.; JOHNSTON, R.E. **Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse.** Virology 208: 662-671. 1995.

CHEUNG, T.F.; CARDINAL, R.N. **Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats.** BMC Neurosci. May 13;6:36. 2005.

CLEMENT, Y.C.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. **Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review.** Brain Res Bull 57: 57-71. 2002.

CLEMENT, Y.; CHAPOUTHIER, G. **Biological bases of anxiety.** Neurosci Biobehav Rev. Sep;22(5):623-33. 1998.

CORONA, G. et al. **Body weight loss reverts obesity-associated hypogonadotropic hypogonadism: a systematic review and meta-analysis.** Eur J Endocrinol. May 2;168(6):829-43. 2013.

CROTTY, S. et al. **Poliovirus pathogenesis in a new poliovirus receptor transgenic mouse model: age-dependent paralysis and a mucosal route of infection.** J. Gen. Virol. 83 1707-1720. 2002.

CRUZ, E.R. **Ultrastructural lesions of the brain in albino mice experimentally inoculated with Piry virus (BeAn 24232).** Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo. Sep-Oct 23(5): 194-203. 1981.



DE ARAÚJO, A.L. et al. **Preventing or reversing immunosenescence: can exercise be an immunotherapy?** *Immunotherapy*. Aug;5(8):879-93. 2013.

DE ARAÚJO, R. et al. **Experimental myocarditis in albino mice induced by Piry virus (BeAn 24232). Anatomico-pathological study using optical microscopy and electron microscopy with demonstration of viral particles.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 20(2): 102-11. 1978.

DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. **An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging.** *Curr Pharm Des*. 15(26):3003-26. 2009.

DE PAOLA, D.; BRUNO-LOBO, M.; DUARTE, F. **Histopatologia experimental dos arbovírus dos grupos C e Guamá.** In: *Anais de Microbiologia II (parte B)*: 132-160. 1963.

DE SOUSA, A.A., et al. **Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice.** *PLoS ONE* ;6:e15597. 2011

DE VEER, M.J. et al. **Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays.** [J Leukoc Biol](#). Jun;69(6):912-20. 2001.

DIAS, L.B. **Histopatologia das arboviroses amazônicas** In: *Simpósio Internacional Sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ: 171-174. 1982.

DIAS, L.B. **Patologia natural e experimental de arbovírus e vírus correlatos isolados na Amazônia.** In: *Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical*. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública 1: 439-450. 1986.

DOBLER, G. **Arboviruses causing neurological disorders in the central nervous system.** *Arch. Virol. Suppl* 11: 33-40. 1996.

DUNN, A.J.; CHAPMAN, Y.; ANTOON, M. **Endotoxin-induced behavioral changes of mice in the multicompartiment chamber are distinct from those of interleukin-1.** *Neuroscience Research Communication* 10: 63-69. 1992.

EICHENBAUM, H. **A cortical-hippocampal system for declarative memory.** *Nat. Rev. Neurosci.* 1 (1): 41-50. 2000.



EKDAHL, C.T. KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. **Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia.** *Neuroscience.* 158: 1021–1029. 2009.

EPP, J.R.; SPRITZER, M.D.; GALEA, L.A. **Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation.** *Neuroscience* 149(2): 273-85. 2007.

EVERETT, H.; McFADDEN, G. **Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria.** *Virology* 288: 1–7. 2001.

FAUCI, A.S. **Infectious diseases: considerations for the 21st century.** *Clin Infect Dis* 32(5): 675-85. 2001.

FAZAKERLEY, J.K. **Semliki forest virus infection of laboratory mice: a model to study the pathogenesis of viral encephalitis.** *Arch. Virol. Suppl:* 179-190. 2004.

FELTON, L.M., et al. **MCP-1 and murine prion disease: separation of early behavioural dysfunction from overt clinical disease.** *Neurobiol Dis;* 20:283–95. 2005.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. **The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear.** *Neurosci Biobehav Rev* 23(5): 743-60. 1999.

FISCHER, C.P. et al. **Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity.** *Scand J Med Sci Sports.* Oct;17(5):580-7. 2007.

FIGUEIREDO, L.T.M. et al. **Níveis de anticorpos para arbovírus da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil)** *Rev. Saúde Públ. S. Paulo* 20: 204-11. 1986.

FILE, S.E. **Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse.** *Behav Brain Res* 125: 151-7. 2001.

FORGER, J.M. et al. **Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2d system.** *J Virol* 65(9): 4950-8. 1991.

FU, Z.F. **Genetic comparison of the rhabdoviruses from animals and plants.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 292:1-24. 2005

GARDEN, G.A.; MOLLER, T. **Microglia Biology in Health and Disease.** *J Neuroimmune Pharmacol* 1: 127-137. 2006.



GOMES-LEAL, W. et al. **Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice.** Acta Tropica 97: 126–139. 2006.

GRIFFIN, D.E. **Arboviruses and the central nervous system.** Springer Semin. Immunopathol 17: 121-132. 1995.

GUENTHER, K., et al. **Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone.** Eur J Neurosci ;14:401–9. 2001

GUERREIRO-DINIZ, C. **Ensaio Estereológicos e Morfologia Tridimensional na Formação Hipocampal de Aves Migratórias Marinhas: Análise quantitativa da imunomarcção seletiva de neurônios e micróglia em Calidris pusilla e Actitis macularia.** (PhD). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém - Pará – Brasil. p.118. 2013.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. **Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 327(1): 1-5. 1984.

HANNAN, A.J. **Enriched environment, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.** Nat Rev. Neurosci 7: 697-709. 2006.

HART, A.D., et al. **Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences.** Brain Behav Immun ;26:754–65. 2012

HEGMANN, J.P.; DE FRIES, C. **Open-field behaviour in mice, genetic analysis of repeated measures.** Psychon Sci 13: 27-8. 1968.

HIRASE, H. & SHINOHARA, Y. **Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment.** PII: S0306-4522: 00780-5. 2014

HOGUE, J.; KESNER, P.R. **Role of CA3 e CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects.** Neurobiology of Learning and Memory 88: 225-231. 2007.

HOSSEINI-SHARIFABAD, M.; NYENGAARD, J.R. **Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus.** J Neurosci Methods 162:206-214. 2007.



- HANDLEY, S.L. **5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment.** *Pharmacol Ther.* Apr;66(1):103-48. 1995.
- HUNEYCUTT, B.S. et al. **Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis.** *Brain Res* 635: 81-95. 1994.
- HUNSPERGER, E.A.; ROEHRUG, J.T. **Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice.** *J. Neurovirol* 12: 129-139. 2006.
- IMAI, Y.; KOHSAKA, S. **Intracellular Signaling in M-CSF-Induced Microglia Activation: Role of Iba1.** *Glia* 40:164–174. 2002.
- ITO, D., et al. **Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.** *Brain Res Mol Brain Res*, 57:1–9. 1998
- JACKSON, A.C. et al. **Quantitative study of the infection in brain neurons in human rabies.** *J. Med. Virol.* 65: 614-618. 2001.
- JALINEK, H. **MicroMod – an L- systems approach to neuron modelling. Proceedings of the Sixth Australasia-Japan Join Workshop on Intelligent and Evolutionary systems.** Australian National University, Canberra, p. 156-163. 2002.
- JEFFREY, R.A. et al. **Activity-dependent anchoring of importin alpha at the synapse involves regulated binding to the cytoplasmic tail of the NR1-1a subunit of the NMDA receptor.** *J Neurosci.* Dec 16;29(50):15613-20. 2009.
- JIANG, J.; FISHER, E.M.; MURASKO, D.M. **Intrinsic defects in CD8 T cells with aging contribute to impaired primary antiviral responses.** *Exp Gerontol.* Jun;48(6):579-86. Epub 2013 Mar 6. 2013.
- JIRKOF, P. **Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice.** *Journal of Neuroscience Methods* 234 139–146. 2014
- JOHNSON, A.J.; ROEHRIG, J.T. **New mouse model for dengue virus vaccine testing.** *J Virol.* Jan;73(1):783-6. 1999.
- JOHNSTON, S.C.; HAUSER, S.L. **Neurological disease on the global agenda.** *Annals of neurology* v. 64, p.A11-12. 2008.



JULKUNEM, I. Et al. **Inflammatory responses in influenza A vírus infection.** Vaccine 19 Suppl 1: S32-7. 2000.

KAM, Y., et al. **Nest expansion assay: a cancer systems biology approach to in vitro invasion measurements.** BMC Res. Notes 2:130. 2008

KARPERIEN, A.; AHAMMER, H.; JELINEK, H. F. **Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis.** Front Cell Neurosci, v. 7, p. 3. 2013.

KETTERNMANN, H. et al. **Physiology of microglia.** Physiol. Rev. 91, 461–553. 2011.

KOHL, S. **The diagnosis and treatment of neonatal herpes simplex virus infection.** Pediatr Ann. Nov; 31(11):726-32. 2002.

KOHMAN, R.A.; RHODES, J.S. **Neurogenesis, inflammation and behavior.** Brain, Behavior, and Immunity 27: 22–32. 2013.

KONAT, G.W. et al. **Peripheral challenge with double-stranded RNA elicits global up-regulation of cytokine gene expression in the brain.** J Neurosci Res 87:1381-1388. 2009.

KORTE, S.M.; DE BOER, S.F. **A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze.** Eur J Pharmacol. Feb 28;463(1-3):163-75. 2003.

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

KUZMIN, I.V. et al. **The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution.** Infect Genet Evol v. 9, p.541-553. 2009

LANE, J. H. Et al. **Neuroinvasion by simian immunodeficiency virus coincides with increased numbers of perivascular macrophages/microglia and intrathecal immune activation.** J. Neurovirol 2: 423-432. 1996.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A.H. **Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats.** Pharmacol Biochem Behav 73(1): 193-207. 2002.



LAVIOLA, G. et al. **Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders.** *Neurobiol Dis* 31, 159–168. 2008.

LEVIN, E.D. et al. **Ventral hippocampal NMDA blockade and nicotinic effects on memory function.** *Brain Res Bull* 61(5): 489-95. 2003.

LINTERMAN, M.A. **How T follicular helper cells and the germinal centre response change with age.** *Immunol Cell Biol.* Jan;92(1):72-9. Epub 2013 Nov 12. 2014.

LISTER, R.G. **The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.** *Psychopharmacology (Berl)* 92(2): 180-5. 1987.

LUNDH, B.; KRISTENSSON, K.; NORRBY, E. **Selective infections of olfactory and respiratory epithelium by vesicular stomatitis and Sendai viruses.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 13: 111-22. 1987.

MANCARDI, D., et al. **Fractal parameters and vascular networks: facts and artifacts.** *Theor. Biol. Med. Model.* 5:12. 2008

McLINDEN, K.A., et al. **Age exacerbates sickness behavior following exposure to a viral mimetic.** *Physiol Behav*;105:1219–25. 2012

MOHAMMED, A.H.H. et al. **Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat.** *Behav Brain Res* 57: 183-91. 1993.

MONTGOMERY, K.C. **The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.** *J Comp Physiol Psychol* 48(4): 254-60. 1955.

MORENS, D.M.; FAUCI, A.S. **Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability.** *PLoS Pathog.* 9(7):e1003-467. Epub 2013 Jul 4. 2013.

MORENS, D.M.; FOLKERS, G.K.; FAUCI, A.S. **The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases.** *Nature.* Jul 8;430(6996):242-9. 2004.

MOSER, M.B.; MOSER, E.I. **Functional differentiation in the hippocampus.** *Hippocampus.* 8(6):608-19. 1998.

NADEL, L.W.; MAcDONALD, L. **Hippocampus: cognitive map or working memory?** *Behav Neurol Biol* 29(3):405-9. 1980.



NIKOLAEV, E.K. et al. **Environmental manipulation differentially alters c-fos expression in amygdaloid nuclei following aversive conditioning.** Brain Res 63: 91-8. 2002.

NITHIANANTHARAJAH, J. & HANNAN, A.J. **Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system.** Nat Rev Neurosci 7:697–709. 2006.

NORDEN, D.M.; GODBOUT, J.P. **Review: Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation.** Neuropathology and Applied Neurobiology, 39, 19–34. 2013.

NUNN, J.; HODGES, H. **Cognitive deficits induced by global cerebral ischaemia: relationship to brain damage and reversal by transplants.** Behav Brain Res 65(1): 1-31. 1994.

OHSAWA, K. et al. **Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity.** Journal of Neurochemistry. 88, 844–856, 2004.

OLIVAL, K.J.; DASZAK, P. **The ecology of emerging neurotropic viruses.** J Neurovirol v. 11, p.441-446. 2005.

O'KEEFE, J. N.; NADEL, L. **The Hippocampus as a Cognitive Map.** Behav Brain Res 83:301-12. 1978.

PANG, T.Y.C. & HANNAN, A.J. **Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity.** Neuropharmacology. 64:515–528. 2013

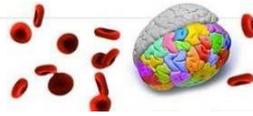
PAPAGEORGIU, I.E. et al. **Widespread activation of microglial cells in the hippocampus of chronic epileptic rats correlates only partially with neurodegeneration.** Brain Struct Funct. 2014.

PEAKE, J.M. **Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action.** Exerc Immunol Rev.8:49-100. 2002.

PELLOW, S. et al. **Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** J Neurosci Methods 14(3): 149-67. 1985.



- PERRY, H.V. & TEELING, J. **Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration.** *Semin Immunopathol* 35:601–612. 2013
- PEZZE, M.A.; BAST, T.; FELDON, J. **Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear.** *Cereb Cortex* 13(4): 371-80. 2003.
- PINHEIRO, F.P. et al. **Infectious diseases along Brazil's Transamazon high way Surveillance and research.** *Bull. Pan. Amer. Hlth Org* 8: III-2. 1974.
- PINHEIRO, F. P. **Piry fever.** *Viral zoonosis.* Boca Raton, CRC Press: 187-90. 1981.
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.V. **Oropouche fever: In: BERAN, G.W. (ed.). CRC Handbook series in zoonoses; Section B. Viral Zoonoses.** Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, p.214-217. 1994.
- PLAKHOV, I.V. et al. **The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system.** *Virology* 209: 257-262. 1995.
- REIS, R.R. **Estudo das alterações neuropatológicas e do comportamento em tarefas hipocampo-dependentes induzidas pela encefalite experimental aguda associada ao vírus Piry.** In: Instituto de Ciências Biológicas, vol. MSc, p 71 Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular: Universidade Federal do Pará. 2012.
- REISS, C.S.; PLAKHOV, I.V.; KOMATSU, T. **Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain.** *Ann N Y Acad Sci* v. 855, p.751-761. 1998.
- REMPEL, J.D. et al. **Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis.** *Virology* 318: 381-392. 2004.
- RENNER, M.J.; ROSENZWEIG, M.R. **The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals.** *Dev Psychobiol.* Jan; 20(1):19-24. 1987.
- RENOIR, T.; PANG, T.Y.; HANNAN, A.J. **Effects of environmental manipulations in genetically targeted animal models of affective disorders.** *Neurobiol Dis.* Sep; 57:12-27. Epub 2012 Apr 16. 2013.



- RODGERS, R.J. **Animal models of 'anxiety': where next?** Behav Pharmacol 8(6-7): 477-96; discussion 497-504. 1997.
- ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. **Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior.** Behav Brain Res. Jun;78(1):57-65. 1996.
- ROULSTON, A.; MARCELLUS, R.C.; BRANTON, P.E. **Viruses and apoptosis.** Annu Ver Microbiol 53: 577-628. 1999.
- ROY, V. **Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor.** Physiol Behav 74(3): 313-20. 2001.
- RUSS, J. C.; ROVNER, I. **Stereological identification of opal phytolith populations from wild and cultivated Zea.** American antiquity, p. 784-792, 1989.
- SADLER, A.J.; WILLIAMS, B.R. **Interferon-inducible antiviral effectors.** Nat Rev Immunol. Jul;8(7):559-68. 2008
- SAHA, S, et al. **Identification of Japanese encephalitis virus-inducible genes in mouse brain and characterization of GARG39/IFIT2 as a microtubule-associated protein.** J. Gen. Virol 87: 3285-3289. 2006.
- SANT, S.P., & FAIRGRIEVE, S.I. **Exsanguinated blood volume estimation using fractal analysis of digital images.** J. Forensic Sci. 57, 610–617. 2012
- SANTOS, Z.; BRAGA, M. **Neurotropismo e neuropatologia secundárias ‘a infecção experimental por espécies virais selecionadas da família Rhabdoviridae e cinética da infecção pelo arbovírus piry em modelo murino.** Belém, Universidade Federal do Pará: 1-60. 2008.
- SCHMID-HOLMES, S, et al. **Burrows and burrow-cleaning behavior of house mice (*Mus musculus domesticus*).** Am Midland Nat;146:53–62. 2001.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K.W. **NIH Image to Image: 25 years of image analysis.** Nat. Meth. 9, 671–675. 2012
- SCHWAB, J.M. & SCHLUESENER, H.J. **Microglia rules: insights into microglial–neuronal signaling, Cell Death and Differentiation:** 11, 1245–1246. 2004.



SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. **Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 20: 11–21. 1957.

SHEK, T.; ARAI, Y. **Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus.** Neuroreport 6, 2479–2482. 1995.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. **Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: Possible interaction with olfactory sensitivity.** Behav Processes. Sep; 17(3):181-90. 1988.

SPIELMANN, G. et al. **Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man.** Brain Behav Immun. Nov;25(8):1521-9. Epub 2011 Jul 19. 2011.

SQUIRE, L.R. **Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans.** Psychol. Rev. 99(2):195-231.1992.

SUTHERLAND, R.J. et al. **Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships.** Behav Neurol Biol 52(3): 331-56. 1989.

SWIERGIEL, A.H.; DUNN, A.J. **Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior 86: 651–659. 2007.

TEELING, J.L. et al. **Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines.** Brain, Behavior, and Immunity 21 836–850. 2007.

TORRES-PLATAS, S.G. et al. **Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex.** J Neuroinflammation 11:12. 2014.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. **Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze.** Pharmacol Biochem Behav 44(2): 463-9. 1993.

VAN DEN POL, A.N. et al. **Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression.** J Comp Neurol v. 516, p.456-481. 2009.

VAN GROEN, T.; MIETTINEN, P.; KADISHI, I. **The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation.** Hippocampus 13(1): 133-49. 2003.



VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. **Neural consequences of environmental enrichment.** Nat Rev Neurosci 1(3): 191-8. 2000.

VASCONCELOS, P.F. et al. **Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses.** Cad Saúde Pública 17 Suppl: 155-64. 2001.

VIANA, I.C., et al. **Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry.** Neuroscience 238: 280–296. 2013

WALSH, N.P. et al. **Position statement. Part one: Immune function and exercise.** Exerc Immunol Rev.17:6-63. 2011.

WENSVEEN, F.M. et al. **Pro-apoptotic protein Noxa regulates memory T cell population size and protects against lethal immunopathology.** J Immunol. Feb 1;190(3):1180-91. doi: 10.4049/jimmunol.1202304. Epub 2012 Dec 31. 2013.

WHITLEY, R. J.; GNANN, J. W. **Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens.** Lancet 359: 507-513. 2002.

WILL, B. et al. **Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002).** Prog Neurobiol 72(3): 167-82. 2004.

WOODS, J.A. et al. **Effects of maximal exercise on natural killer (NK) cell cytotoxicity and responsiveness to interferon-alpha in the young and old.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. Nov;53(6):B430-7. 1998

ZEALLEY, B.; DE GREY, A.D. **Commentary on some recent theses relevant to combating aging: December 2012.** Rejuvenation Res. Dec;15(6):629-30. 2012.

ZHU, S.W. et al. **Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice.** Behav Brain Res 169(1): 10-20. 2006.

ZIELASEK, J.; HARTUNG, H. **Molecular mechanisms of microglial activation.** Advances in Neuroimmunology 6: 191-222. 1996.



ANEXO I



PARECER 222-14

Projeto: ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROPATOLÓGICAS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS PIRY NO CAMUNDONGO SENIL ALBINO SUÍÇO: IMPACTO DO AMBIENTE ENRIQUECIDO.

Coordenador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço-Diniz

Área Temática: Neurociências

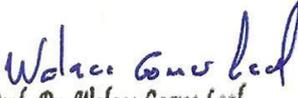
Vigência: 03/2012 a 03/2016

No no CEPAE-UFPA: 222-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 1032/2014 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (Camundongos, N=115) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 março de 2012


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA



ANEXO II

Influences of aging and environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and microglial changes in murine model

Authors: Aline Andrade de Sousa¹, Renata Rodrigues dos Reis¹, Camila Mendes de Lima¹, Marcus Augusto de Oliveira¹, Taiany Nogueira Fernandes², Daniel Guerreiro Diniz¹, Nara Morais Magalhães¹, Cristovam Guerreiro Diniz³, João Bento Torres Neto¹, José Antonio Picanço Diniz Junior³, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos⁴, Cristovam Wanderley Picanço Diniz¹ (*)

¹ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Belém, Pará, Brasil.

² Universidade da Amazônia, Avenida Alcindo Cacela, Belém, Pará, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Campus de Bragança, Belém, Pará, Brasil.

⁴ Instituto Evandro Chagas (IEC), Departamento de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Ananindeua, Pará, Brasil.

(*) Corresponding Author: Cristovam Wanderley Picanço-Diniz, MD, PhD

Address: Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Rua Dos Mundurucus 4487, Zip Code: 66073005 - Belém

– Pará – Brazil, e-mail: cwpdiniz@gmail.com, telephone/fax 0055(91) 32016756



ABSTRACT

Environmental enrichment and aging effects on behavioral and microglial morphological changes were investigated in a murine model of sub-lethal arbovirus encephalitis. To that end two-months-old female albino Swiss mice were raised in impoverished (IE) or in enriched environments (EE) during 6 (young - Y) or 16 (aged - A) months. After behavioral tests, Y and A mice were nasally instilled with an equal volume of Piry virus infected (Py) or normal brain homogenates. Eight days post-infection (dpi), when behavioral changes became apparent, mice brains sections were immunoreacted with anti-IBA1 (microglia) and anti-Piry virus antibodies. At 20 and 40 dpi, the remaining infected animals were behaviorally re-tested, and processed for the same markers. In infected young mice from impoverished environment (IYPy), burrowing activity decreased and recovered earlier (8–10 dpi) than open field activity (20–40 dpi) but remained unaltered in age-matched mice from enriched environment (EYPy). In contrast, aged infected mice, both from enriched (EAPy) and impoverished (IAPy) environments, reduced significantly burrowing activity at all-time windows. Piry virus encephalitis induced transitory olfactory losses in IYPy and EYPy but permanent in IAPy and EAPy. Piry virus antigens immunolabeling reached a peak in CNS parenchyma at 5 and 6dpi and disappeared at 8dpi. All microglia three-dimensional reconstructions were done at 8dpi. Microglial changes were significantly more severe in young adult than in aged mice but EY mice seem to recover to the microglial homeostatic morphology earlier than IY. EE beneficial effects were smaller in aged mice.

Key words: arbovirus encephalitis; aging; enriched environment; microglial and behavioral changes

INTRODUCTION



Sub-lethal encephalitis following viral infections is known to affect behavior and the immune response, and viral diseases of the central nervous system (CNS) represent a significant proportion of neurological disabilities, particularly in poor countries (Johnston and Hauser, 2008). Emerging virus infections of the CNS are mainly associated with RNA viruses and many that cause neurologic disease (Olival and Daszak, 2005). The rhabdoviruses are part of the broad group of negative-strand RNA viruses, which includes a number of medically relevant viruses such as avian influenza, measles, Ebola, and vesicular stomatitis virus (VSV) (Kuzmin et al., 2009). Because VSV has limited human pathogenicity, it has been used as a model of rhabdoviruses in both *in vitro* and *in vivo* studies investigating viral adaptive and host immune responses (Reiss et al., 1998, van den Pol et al., 2009).

Infections of the CNS with cytopathic neurotropic viruses, such as vesiculoviruses, require the parenchymal penetration of dendritic cells, T lymphocytes, and microglial activation for virus clearance and survival (McCandless et al., 2008, Liu et al., 2009, Steel et al., 2009). Because T cell migration to the brain parenchyma enhances viral clearance in VSV encephalitis (Ciavarra et al., 2006), in a series of previous experiments we have demonstrated using, the Piry arbovirus (Rhabdoviridae family), that environmental enrichment leads to less CNS neuroinvasion and/or more rapid viral clearance in association with T-cells without neuronal damage. We have found in young adults housed in enriched environment as compared to animals from standard cages, a higher T-cell infiltration, less CNS cell infection by the virus, faster virus clearance, less microgliosis, and less damage to the extracellular matrix (de Sousa et al., 2011).

There is now unambiguous evidence of important changes in the senescent immune system. Among those, there are the changes in T-cell subsets, the pattern of

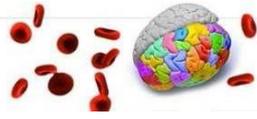


secreted cytokines, the ability of cell replication and production of antibodies, creating a pro-inflammatory environment associated with decreased responsiveness to new antigens (de Araújo et al., 2013). Based on previous demonstrations that physically active older adults show less functional decline in T and B cell-mediated adaptive immunity than age-matched adults with a sedentary life style (Simpson and Guy, 2010), in the present report we hypothesized that aged mice from IE would show more intense behavioral changes, higher mortality, higher microglial morphological changes and T lymphocyte less expansion than mice from EE.

In the present report, we expanded our previous investigation into aged mice to establish a model of sub-lethal arbovirus encephalitis to investigate host inflammatory response in the senescent immune system. To that end we induced Piry viral encephalitis in aged albino Swiss mouse model housed in an enriched or impoverished environment to mimic active and sedentary life styles respectively, and compared with young mice raised in similar conditions.

METHODS

All procedures were submitted to and approved by the institutional animal care committee of the Federal University of Pará. We used 174 2-week-old albino Swiss mice obtained from the Animal Care Facility of Instituto Evandro Chagas and handled in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH). To confirm the presence of the virus in the brains of animals used to prepare infected brain homogenate, some of the animals were processed to obtain ultrathin sections for analysis with a Zeiss EM 900 transmission electron microscope, as described elsewhere (Diniz et al., 2006, de Sousa et al., 2011).



Behavioral analysis

The young mice (n= 59) were kept in an impoverished environment (IE, n =31) or enriched environment (EE, n = 28) for three months whereas aged mice (n = 115) were maintained in an impoverished (IA, n = 51) or enriched (EA, n = 64) environment during 16 – 20 months, and then submitted to the following tests: open field, burrowing and olfactory memory. Enriched environmental conditions corresponded to plastic cages (32 cm x 639 cm x 616.5 cm) with chopped rice straw on the floor and equipped with rod bridges, tunnels, running wheels, and toys made of plastic, wood, or metal with different forms and colors that were changed every week. The IE cages corresponded to plastic cages with the same dimensions and chopped rice straw on the floor but without equipment or toys. Each cage housed 12–15 mice. All mice had free access to water and food, and 12-h dark and light cycles were maintained. Tests occurred during the light cycle.

Burrowing: Two hours daily (from 09:00 to 11:00 h) for 3 consecutive days before inoculation and from post-inoculation days 2 to 35, all animals were placed in individual plastic cages (32 cm x 39 cm x 16.5 cm) containing a PVC tube (20 cm long, 7.2 cm diameter) filled with 250 g of normal diet food pellets. The open end was supported 3 cm above the floor. After the testing period, the remaining food in the cylinders was weighed and the mice returned to their collective cage (Deacon et al., 2001).

Open field: The apparatus consisted of a gray PVC box (30 cm x 30 cm x 40 cm) with the floor divided into 9 squares of 10. For 3 consecutive days before inoculation, each animal was placed in one corner and kept in the apparatus for 5 min. One meter above



the open field, a video camera connected to a computer recorded each training session for later analysis by Any-Maze software (Stöelting). The following parameters were analyzed: distance traveled (m), mean speed (m/s), and immobility time (s). After each section, the open field was cleaned with 70% ethanol.

Olfactory memory: The test was performed in a box divided into three compartments (one central and two lateral) and follow previous published protocol (Soffié and Lamberty, 1988). One of the side compartments contained spoiled straw originating from the cage of mice under test and the other contained clean straw. The animals were placed one at a time in the central compartment facing the wall and the behavior was recorded by a camera for 5 minutes. The time spent in the compartments containing the dirty and clean straw were recorded as well as the side that every animal chose to go first.

Experimental groups and inoculation

Suckling mice were intracerebrally infected with 10 ml of infected brain suspension, anesthetized, and perfused after becoming sick. The brains were histologically processed for immunohistochemistry procedures using specific anti-Piry virus antibodies. Virus-containing brain homogenates were obtained as follows. First, 0.02 ml of each viral suspension was intracerebrally inoculated into newborn mice, and the animals were observed daily. Upon presenting with clinical signs, the animals were sacrificed and immediately stored at -80°C . Later, the brain tissue (0.2 g/animal) was macerated and mixed with 1.8 ml phosphate- buffered saline (PBS) containing 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. The suspension was cleared by centrifugation at 10,000G for 15 min at 4°C . Virus titration was carried out by



intracerebral inoculation of newborn mice with 0.02 ml of serial 10-fold dilutions of the viral suspensions in PBS, and LD50 values were calculated by the method of Reed and Muench. The Piry virus titers in the sample (LD50/0.02 ml) were 8.0 Log₁₀. The choice of viral concentration obeyed the criterion of using a non-lethal dose that still induces a sublethal encephalitis.

After behavioral tests, all animals were anesthetized with intraperitoneal 2,2,2-tribromoethanol 1% (0.01 ml/g of body weight) and intra-nasally challenged with 5 ml viral suspension (1025 v/v in 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin) or normal brain homogenate as a control (10% v/v in 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin). After recovering, animals were housed in enriched or standard plastic cages (32 cm x 639 cm x 616.5 cm) and maintained in the Instituto Evandro Chagas (Belém – PA) animal house, where they remained until the end of the experiments. All animals were kept in the care facility room at $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with ad libitum access to food and water and with a 12-h light/dark cycle.

All mice were tested again (open field, burrowing, dark/light box, and elevated plus maze) after 20 dpi or 40 dpi.

Statistical Analysis of Behavioral Changes

To distinguish significant differences between groups on the behavioral tasks we used one-way ANOVA for repeated measurements and two-way ANOVA using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. CA, USA) to compare burrowing activity. To compare locomotor activity in the open field and olfactory memory we used two tail t-test for dependent samples using Bioestat (Ayres et al., 2007). Differences between groups was accepted as significant at 95% confidence level ($p < 0.05$).



Neuropathology

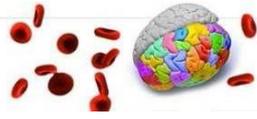
When each animal reached the survival time of its group after behavioral tests, the mice were weighed and anesthetized with intraperitoneal 2,2,2-tribromoethanol (0.04 ml/g of body weight) and transcardially perfused with heparinized saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2–7.4). Alternate series of sections (70 μ m thickness) obtained using a Vibratome (Micron) were immunolabeled with polyclonal antibody for Piry virus antigens, monoclonal antibody for glial fibrillary acid protein (GFAP) to detect astrocytes, or monoclonal antibody for CD3- and CD8-positive T cells or histochemically reacted to detect the biotinylated lectins *Lycopersicon esculentum* (activated microglia) and *Wisteria floribunda* (PNs) supplied by Vector Laboratories (CA, USA). All chemicals used in this investigation were supplied by Sigma-Aldrich (Poole, UK) or Vector Laboratories (CA, USA), and the GFAP and Piry primary antibodies were from Chemicon (CA, USA) and Instituto Evandro Chagas (PA, Brazil), respectively.

Immunohistochemistry and histochemistry

To assess the distribution of Piry viral antigens, CD8 T cells, and astrocytes in the mouse brain at the different time points, immunohistochemistry was performed on all infected and in five control animals. Specific antibodies against Piry virus species were produced by the Department of Arbovirus and Hemorrhagic Fevers at the Instituto Evandro Chagas, as described elsewhere (Travassos da Rosa et al., 2001, Diniz et al., 2006). In brief, free-floating sections were rinsed in 0.1 M phosphate buffer and placed in a solution of 0.2 M boric acid (pH 9.0) at 70°C for 1 h for antigen retrieval. After being rinsed in 0.1 M PBS with 5% Triton X-100, sections were incubated in a solution of methanol and 0.3% hydrogen peroxide for 10 min. After washing in PBS, the Mouse-



on-Mouse (MOM) Blocking Kit (M.O.M. kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used as follows: MOM IgG blocking for 1 h, primary antibody for 72 h (GFAP 1:800, Chemicon, CA, USA; anti-CD3 T lymphocytes 1:1000, MCA500G and anti-CD 43 MCA1096 1:200 AbD Serotec, Oxford, England, UK; anti-CD8 T lymphocytes 1:100, Cod 140083 eBioscience, San Diego, CA, USA; anti-Piry 1:20, Instituto Evandro Chagas, PA, Brazil), and MOM Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent for 12 h. Sections were washed in PBS and transferred to avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) (Vector Laboratories) solution for 1 h, washed again before incubation in 0.2 M acetate buffer (pH 6.0) for 5 min, and revealed in GND solution (diaminobenzidine 0.6 mg/ml, ammonium nickel chloride 2.5 mg/ml, and glucose oxidase). All steps were carried out under gentle and constant agitation. All chemicals used in this investigation were supplied by Sigma-Aldrich (Poole, UK). As a negative control, normal horse serum was added to some slides instead of primary antibody for each antibody used as a cell marker and processed for immunohistochemistry as previously described. Other sections were used to detect microglia activation and PNs by histochemistry with biotinylated *Lycopersicum esculentum* (tomato) lectin and biotinylated *Wisteria floribunda* lectin, respectively, according to manufacturers' instructions with small adaptations. Briefly, sections were rinsed in PBS with 5% Triton X 100 for 20 min and transferred to a solution of methanol and 0.1% hydrogen peroxidase for 10 min. After being washed in PBS, the sections were incubated in the lectin solutions (*Lycopersicum esculentum*, 6 mg/ml; *Wisteria floribunda*, 9 mg/ml) overnight at 4⁰C, placed in ABC solution for 1 h, and revealed with GND solution following the same protocol previously described for immunohistochemistry. After this process, some of the sections reacted for *Lycopersicum esculentum* were counterstained in 0.5% cresyl violet.



Microglial Cell 3-D Reconstruction and Quantitative Morphology

To analyze brain sections, we used a NIKON Eclipse 80i microscope (Nikon, Japan), equipped with a motorized stage (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Microglia from dorsal CA3 were analyzed under oil immersion, with a high-resolution, 100 \times oil immersion, plan fluoride objective (Nikon, NA 1.3, DF = 0.19 μ m). Images were acquired with NeuroLucida software (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, USA). Although shrinkage in the z-axis is not a linear event, the software used in the present study corrected the shrinkage in the z-axis, based on previous evidence of 75% shrinkage (Carlo and Stevens, 2011). Without correction, this shrinkage would significantly distort the length measurements along this axis. Only cells with dendritic trees that were unequivocally complete were included for 3D analysis (cells were discarded when dendrite branches appeared artificially cut or not fully immunolabeled). Terminal branches were typically thin. Although many morphological features were analyzed, here, we described only those that were significantly different between subjects. We estimated and compared 21 microglial morphological parameters; 10 related to the soma and 11 to the microglial branches, as follows: 1. Branch length (μ m); 2. Total tree length (μ m) 3. Surface area (μ m²); 4. Branch volume (μ m³); 5. Segments/mm; 6. Tortuosity; 7. Fractal dimensions (k-dim); 8. Base diameter of the primary branch (μ m); 9. Total number of segments; 10. Planar angle; 11. Number of trees; 12. Soma area (μ m²); 13. Soma perimeter; 14. Ferret minimum diameter; 15. Ferret maximum diameter (maximum diameter in a shape); 16. Compactness; 17. Form factor; 18. Solidity; 19. Roundness; 20. Aspect ratio; and 21. Convexity. Thus, all microglia of each area or lamina of interest were measured multiple times, and dedicated software (Neuroexplorer, MicroBright Field Inc.) was



used to process data obtained with Neurolucida. These morphological parameters (defined in Table 1) were used to investigate possible features shared by CA3 microglia. For detailed information and definitions please see: <http://mbfbioscience.com/technical-support-center>

Please insert Table 1 around here

CA3 Limits and Sampling Rules

To define the limits of CA3 we used architectonic differences in the neuropil after *Wisteria floribunda* histochemistry, in which CA2 appears much darker than CA3, with a marked difference in the thickness of CA3 and CA2 pyramidal layer, readily visible in Nissl counterstained sections (Figure 1). Systematic and random samples were taken from a series of sections containing CA3 dorsal to guarantee that all regions of CA3 dorsal had the same probability to be included in the samples (Figure 1). Each green box inside the green line contour of CA3, indicates a site from where we selected a single microglia for three-dimensional reconstruction. Using this sampling methodology we have reconstructed 640 microglia from eight experimental groups (IA, IY, IAPy, IYPy, EA, EY, EAPy, EYPy), 80 from each experimental group.

Please insert Figure 1 around here

Microglia Morphometry and Statistical Analyses

Because CA3 was far from the anatomical olfactory pathways invaded by PirY virus, microglial branches and soma could be readily distinguished and reconstructed. We first investigated the presence of morphological features shared by the three-



dimensional microglia reconstructions of each group. To that end we submitted all morphometric microglial quantitative variables to an initial cluster analysis (tree clustering method, Euclidean distances, and complete linkage), which included all subjects from all experimental groups. Cluster analysis or clustering is the task of grouping a set of objects of interest in such a way that objects in the same group (called a cluster) are more similar to each other than to those in other groups (clusters). We applied this multivariate statistical procedure to our sample of microglia to search for potential microglial classes. The microglial classes based on morphological similarities, suggested by cluster analysis were further assessed with a forward stepwise discriminant function analysis, performed with Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK). Discriminant function analysis is used to determine which variables discriminate between two or more naturally occurring clusters. The idea underlying this procedure is to determine whether clusters differ with regard to the mean of a variable, and then to use that variable to predict cluster membership. In addition, the arithmetic mean and standard deviation were calculated for the variables chosen as the best predictors for the microglia groups.

In addition three-way ANOVA (between subject factors, pairwise comparisons independent groups, honestly significant difference (HSD) -- Pairwise comparisons for k-between group designs) was used to investigate the influences of age, infection and environment on microglial morphological features, with differences between groups accepted as significant at 95% confidence level ($p < 0.05$).

Photomicrography

For photomicrographs, we used a digital camera (Axiocan - HRC, Zeiss, Gottingen,



Germany), coupled to a NIKON Eclipse 80i microscope. Digital photomicrographs were processed with Adobe Photoshop software; scaling and adjustments to the brightness and contrast were applied to the whole image. To illustrate morphological differences between microglia of each experimental group, we selected 3-D microglial reconstructions with morphometric values close to the mean value of each group.

RESULTS

Piry virus Neuroinvasion

Immunostaining with anti-Piry virus antibodies revealed neuroinvasion of olfactory bulb, olfactory nuclei, olfactory tubercles, piriform cortex, septum, amygdala, ventral hippocampus, hippocampal fimbria, polymorphic layer of the ventral dentate gyrus, and CA3 ventral.

Figure 2 shows low and higher power pictures photomicrographs from CA3 IBA1 immunolabeled sections from aged mice raised in impoverished and enriched environments at 7th and 10th dpi. Aged mice from enriched environment seem to recover the microglial homeostatic morphology earlier than age matched mice from impoverished environment. Indeed, at 10 dpi microglial morphology from CA3 of infected mice brain is closer to the morphology of CA3 uninfected mice (see Figures 4A and 4B for morphological comparisons with microglia from uninfected mice). All microglial three-dimensional reconstructions of the present report were done at 8th dpi.

Please insert Figure 2 around here

Microglial morphological changes were significantly more severe in infected young adult than in aged infected mice.



A total of 640 microglial cells were digitally reconstructed in three dimensions from CA3 dorsal of albino Swiss mice, 80 from each experimental group. Figure 3 are graphic representations of distinct microglial morphological features to illustrate significant differences between infected and non-infected aged and young mice raised either in enriched or impoverished environments. Three-way ANOVA between subject factors, pairwise comparisons for independent groups - honestly significant difference (HSD), was used to investigate the influences of age, infection and environment on microglial morphological features. Significant differences were set for pairwise comparisons as [Q=TukeyHSD: $p < 0.05$, or $p < 0.01$] and this analysis revealed that age, environment and infection influenced many of the dorsal CA3 microglial morphological features. In some cases all variables (environment, age and infection) interact and influence microglial changes as follow: branch volume ($F_{1,632} = 11.1$; $p < 0.0009$); base diameter of the primary branch ($F_{1,632} = 20.3$; $p < 0.000008$); segments/mm ($F_{1,632} = 14.3$ $p < 0.0002$); average branch length ($F_{1,632} = 13.8$ $p < 0.00022$); K-dim ($F_{1,632} = 10.2$ $p < 0.00151$); planar angle ($F_{1,632} = 10.6$ $p < 0.0012$); Feret max ($F_{1,632} = 5.34$; $p < 0.02$); form factor ($F_{1,632} = 5.61$ $p < 0.0182$) and convexity ($F_{1,632} = 22.9$ $p < 0.000002$).

We selected in Figure 3 graphic representations of mean values and correspondent standard errors of the microglia morphological features from branches and soma features that most contributed to distinguish experimental groups; please see Table 2 for further details.

Please insert Table 2 and Figure 3 around here
--

Taken together our findings demonstrate that as compared to uninfected mice, independent of the environment or age, the volumes of branches and trees of microglia



increased two to three times at 8 dpi. Similarly, infected young mice from both enriched and impoverished environments as compared to respective controls, increased significantly their base diameters of primary branches and density of segments, and these effects were more intense in the subjects from enriched environment (Figure 3, Table 2). Except for aged infected mice from enriched environment which is not different from the correspondent control, the average segment length of microglia from infected animals are, smaller than that of uninfected mice, and this effect was more intense in young than in aged mice. Morphological measurements of the microglial cell bodies revealed that infected animals show an enlargement of the soma (soma area, Feret min and max diameters) independent of age or environment. However, Piry virus infection showed opposite effects as a function of age on the convexity and form factor of the microglia cell body. Indeed, as compared to respective controls, whereas the convexity and form factor mean values reduced in infected young mice, they increased in aged infected mice, and these effects were higher in mice from enriched environment (Figure 3).

Figures 4A and 4B illustrate three-dimensional reconstructions and correspondent dendrograms and photomicrographs of selected microglia with the mean values of morphological features, close to those of their experimental groups.

Please insert Figure 4A and 4B around here

Cluster and discriminant analysis from all experimental groups (Figure 5) suggested the occurrence of three distinct main clusters of microglia. Indeed with a single animal exception (IY1), the two clusters on the right side (red lines) contain only infected subjects and most of the subjects on the left cluster represent the microglial sample from control individuals. However three of four aged infected mice from



enriched, and one in four from impoverished environment, are clustered together with the control groups (Figure 5A), suggesting that microglial changes after infection in those aged subjects were less significant. Figure 5B is a graphic representation of the discriminant analysis. This analysis revealed that the total volume ($p < 1 \times 10^{-6}$), density of segments ($p = 0.021$), surface area ($p = 0.027$) and the total number of segments ($p = 0.0069$) were the morphometric features that most contributed to the clusters formation. The results suggested that our sample comprised three main classes of microglia distinguished by Euclidian distances above 3000. Two of these clustered microglia corresponded to infected animals and another one corresponded to the microglia from control animals and aged infected mice from enriched environment. However, if we choose Euclidian distances above 1000 as a reference point to analyze cluster formation (see green line in Figure 5B), then we find five different microglial clusters, three of which corresponding to infected mice, and two others corresponding to control groups and to the subjects from aged mice infected group (EAPy) from enriched environment which is not statistically different from their respective controls (EA).

Please insert Figures 5A and 5B around here

Permanent losses on burrowing activity in aged Piry virus infected mice.

Figure 6 illustrates burrowing activity before and after inoculation of normal (EA and IA) and infected brain homogenates with Piry arbovirus (EAPy and IAPy) in aged mice. At 7dpi a significant and permanent decrease in the amount of burrowed food was detected in aged mice, independent of the environment where the subjects were raised. In young mice no burrowing changes were observed in infected young mice from enriched environment but a transitory change was detected in mice from



impoverished environment. Indeed in these mice a significant decrease of the burrowing activity occurred at 8 and 10dpi followed by a complete recovering of this activity at 13dpi (de Sousa et al., 2011).

Please insert Figure 6 around here

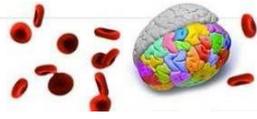
Permanent olfactory losses in aged infected mice with Piry virus

Figure 7 illustrates olfactory tests results before (BL) and after inoculation of infected brain homogenate with Piry arbovirus (EAPy and IAPy) in aged mice. Note that as compared to baseline, infected mice were not able to distinguish between familiar and new odors at all-time windows (8, 20 and 40dpi) whereas control groups (EA and IA), did not show any impairment. In contrast, only adult infected mice from impoverished environment lost that ability at 9 dpi (Reis, 2012).

Please insert Figure 7 around here

Transitory locomotor and exploratory activity changes in Piry virus infected aged mice from impoverished environment.

Different from burrowing and olphactory discrimination, open field locomotor activity was impaired later in the disease and seem to be a transitory impairment limited to aged mice from impoverished environment at 20dpi (Figure 8). Similarly, locomotor and exploratory activities assessed by open-field tests in adult mice appeared altered later in the disease (20 dpi) and remained so at 40 dpi in IEPy, whereas no significant change was observed in EEPy (de Sousa et al., 2011).

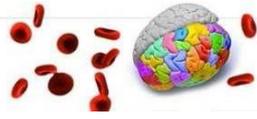


Please insert Figure 8 around here

Taken together our findings revealed that the severity of microglial morphological changes did not show simple correlations with permanent behavioral deficits in aged mice suggesting that microglial changes in isolation may not explain CNS damage induced by Piry virus encephalitis during senescence.

DISCUSSION

Using Piry virus as a model to study encephalitis outcomes in adult albino Swiss mice housed under IE or EE conditions, we previously induced viral encephalitis by intranasal inoculation of Piry virus–infected brain homogenate and correlated neuropathological features quantified using a stereologically based unbiased method with behavioral changes, comparing the outcomes with those of animals inoculated with uninfected brain homogenate (de Sousa et al., 2011). In the present report we expanded our investigation to aged mice and test the hypothesis that the intensity of microglial changes would be associated with more severe behavioral impairments. To that end we used three-dimensional reconstructions and multivariate statistical analysis. We found that aged infected mice, independently of the environment where they were raised, reduced permanently burrowing activity and olfactory discrimination and transitorily the exploratory and locomotor activities in the open field. Microglial morphological changes in aged mice were less intense than that in young mice indicating that the reduced inflammatory response in immunosenescent individuals may aggravate encephalitis outcomes.



A few reports used microscopic three-dimensional reconstruction of microglia to describe their morphological changes under homeostatic and neuropathological conditions (Papageorgiou et al., 2014, Torres-Platas et al., 2014), but none of them were dedicated to quantify the subtleties of microglial changes in aged and adult infected mice brain, under an arbovirus attack. As a result, quantitative associations between microglial three-dimensional morphology and behavioral changes in murine models of encephalitis have not been firmly established.

Combining random systematic sampling to guarantee that all regions of CA3 would have the same probability to contribute to the sample and multivariate statistical analysis we have shown here that the severity of the behavioral impairments was not directly correlated with the intensity of microglial morphological changes. We also demonstrated that behavioral and microglial morphological changes associated with Piry virus encephalitis were more intense in animals living under IE conditions in comparison with encephalitis outcomes in mice housed under EE conditions, and that the microglial morphological changes were far more severe in adult than in aged mice.

Microglial morphological changes and behavioral deficits

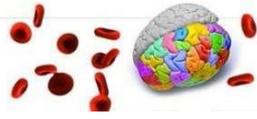
Our previous findings using Piry virus as an encephalitis model in adult female Swiss mice revealed microglial host response more intense and generalized in the brain parenchyma at 8 dpi compared to 20 or 40 dpi (de Sousa et al., 2011). These previous findings suggest that microglia activation may be one of the key factors in the pathogenesis of Piry virus encephalitis. In the present report we compared the subtleties of microglial morphological changes of adult and aged Piry infected mice at 8dpi using three-dimensional reconstruction in association with correspondent behavioral impairments, and found an inverse association between age, behavioral



impairments and microglial host response. Indeed microglial changes in adult mice were much more intense than in aged mice, whereas behavioral changes were more severe in aged mice. Although the evidence in the present report is indirect and this study is explicitly correlational, it raises the opportunity to provide hypotheses about the relationships between microglial morphological changes, cytopathic virus infections and behavioral deficits. In addition this microglial form-function model provides a good starting point to study the host microglia inflammatory response to virus infection under the influence of distinct environments mimicking sedentary (impoverished environment) and active (enriched environment) life styles.

Morphologically activated microglia following Piry virus neuroinvasion were observed mainly in the olfactory pathways, septal region, amygdala, ventral CA3, and the polymorphic layer of the ventral dentate gyrus. We selected ventral and dorsal hippocampal-dependent tasks (Deacon et al., 2002, Bannerman et al., 2003, Deacon and Rawlins, 2005) and an olfactory discriminative test (Carr et al., 1976, Soffié and Lamberty, 1988) to investigate behavioral changes.

Our previous findings demonstrated in adult Piry infected mice that burrowing changes became apparent at 8 dpi, when IEPy animals burrowed significantly less food than IE controls and continued so until 13 dpi, when burrowing activity recovered to control levels. No significant differences were detected in burrowing between EEPy and EE control adult infected animals (de Sousa et al., 2011). However, in aged mice, independent of the environment, infected subjects start to burrow less food than IE and EE controls at 7 dpi, and remained so, at least until 40 dpi, when the subjects were euthanized. These results are in line with previous reports demonstrating that a systemic inflammation induced by LPS to mimic inflammatory responses to bacterial lipopolysaccharide infection (Teeling et al., 2007) or Poly:IC, a toll-like receptor 3



agonist, mimicking inflammatory responses to systemic viral infection (Konat et al., 2009) reduces burrowing activity. Since burrowing activity requires hippocampal integrity and the ventral hippocampus, dentate gyrus and septal regions were targeted by Piry virus, we suggest that a permanent damage on these areas may contribute at least in part to the sustained reduction in burrowed food in aged infected mice.

In contrast to burrowing activity, locomotor and exploratory activities, assessed by open-field tests, appeared transitorily altered later in the disease (20 dpi) in both adult (de Sousa et al., 2011) and aged mice, but remained so at 40 dpi only in IEPy adult animals. No significant changes were observed in EEPy adult and aged mice. Similarly to our findings LPS systemic injection to mimic bacterial infection reduced open field activity in mice raised in the impoverished environment of standard laboratory cages (Teeling et al., 2007).

Because the olfactory nuclei and projections were intensely targeted by Piry virus and microglial morphological changes correspondently were much more severe on these regions, we suggest that olfactory losses both transitorily in adult mice and permanent in aged subjects are related to inflammatory response and/or cell death along the anatomical pathways related to olfactory function. Similarly olfactory pathways were completely damaged in the encephalitis induced by nostril inoculation with VSV, which reproduces very closely the anatomical olfactory pathways targeted by Piry virus (Lundh et al., 1987, Huneycutt et al., 1993, Bi et al., 1995, Christian et al., 1996).

Technical limitations

In the present report multivariate statistical analysis using morphometric parameters of microglia revealed at least three and possibly five morphologically distinct groups of microglia in the CA3 of infected and uninfected young and aged mice. Two of these types were found in control groups and other three in infected



subjects. Microscopic, 3D reconstructions may be affected by mechanical factors associated with the vibratome sectioning and the dehydration procedure, which can induce non-uniform shrinkage in the z-axis of the sections (Hosseini-Sharifabad and Nyengaard, 2007). Thus, estimates of modifications in the x/y dimensions during tissue processing cannot be linearly extrapolated to the z dimension. These methodological constraints imposed limitations that must be taken into consideration when interpreting the results of the present study. However it must be emphasized that a reliable indication of severe shrinkage in z axis is the curling of branches, signifying that individual processes did not shrink at the same rate as the slice in which they are located. These effects tend to be of higher amplitude at the surface, decreasing in depth in the z-axis. This pattern, however, was not observed in microglia elected to be reconstructed in this study and our sample was taken from the middle region of the z-axis, where the impact of these changes are minor. More recently it has been demonstrated that in the z-axis (perpendicular to the cutting surface) sections shrink to approximately 25% of the cut thickness after dehydration and clearing (Carlo and Stevens, 2011). Based on those findings all microglial reconstructions of the present report were corrected for z-axis shrinkage in 75%. No corrections were applied to X/Y axes that did not change after histological dehydration and clearing.

Another limitation is related to the fact that no stereological procedures were performed to estimate the total number of each type of microglia in the target area of aged mice. However because the criteria to select microglia for three-dimensional reconstructions were systematically blind and random in all subjects, and the number of elements selected for reconstruction was rather wide (640 in total, 80 of each group) it is reasonable to suppose that no *a priori* sample bias was induced by the choice of objects of interest among subjects.



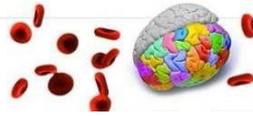
The mechanisms of neuronal protection that are activated during the faster clearance of the viruses from the brains of EE animals remain to be investigated. Detailed cellular and molecular analysis built on these observations, including characterization of the inflammatory cells mobilized to the brain parenchyma as well as viral neuroninvasion and clearance mechanisms, may delineate the pathophysiological basis of these events, improving our understanding of non-pharmacological treatment of neurological disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

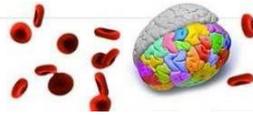
Supporting funds from Fundação de Amparo a Pesquisa do Pará – FADESP; Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará - PROPESP; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; Brazilian Research Council – CNPq Grant number: 307749/2004-5 and 471077/2007-0 for CWPD and Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, Instituto Brasileiro de Neurociências – IBNnet

REFERENCES

- Ayres M, M AJ, Ayres D, Santos AS (2007) BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq.
- Bannerman DM, Grubb M, Deacon RM, Yee BK, Feldon J, Rawlins JN (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139:197-213.
- Bi Z, Barna M, Komatsu T, Reiss CS (1995) Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *J Virol* 69:6466-6472.
- Carlo CN, Stevens CF (2011) Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. *J Comp Neurol* 519:2803-2810.
- Carr WJ, Yee L, Gable D, Marasco E (1976) Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* 90:821-828.
- Christian AY, Barna M, Bi Z, Reiss CS (1996) Host immune response to vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system in C57BL/6 mice. *Viral Immunol* 9:195-205.



- Ciavarra RP, Stephens A, Nagy S, Sekellick M, Steel C (2006) Evaluation of immunological paradigms in a virus model: are dendritic cells critical for antiviral immunity and viral clearance? *J Immunol* 177:492-500.
- de Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, Trévia N, Lins NA, Passos A, Santos Z, Diniz JA, Vasconcelos PF, Cunningham C, Perry VH, Diniz CW (2011) Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PLoS One* 6:e15597.
- Deacon R, Croucher A, Rawlins J (2002) Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res* 132:203-213.
- Deacon R, Raley J, Perry V, Rawlins J (2001) Burrowing into prion disease. *Neuroreport* 12:2053-2057.
- Deacon RMJ, Rawlins JNP (2005) Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioural Brain Research* 156:241-249.
- Diniz J, Nunes M, Travassos da Rosa A, Cruz A, De Souza W, Medeiros D, Chiang J, Vasconcelos P (2006) Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* spp) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus *Bracorhabdovirus*. *Arch Virol* 151:2519-2527.
- Hosseini-Sharifabad M, Nyengaard JR (2007) Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Methods* 162:206-214.
- Huneycutt BS, Bi Z, Aoki CJ, Reiss CS (1993) Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. *J Virol* 67:6698-6706.
- Johnston SC, Hauser SL (2008) Neurological disease on the global agenda. *Ann Neurol* 64:A11-12.
- Konat GW, Borysiewicz E, Fil D, James I (2009) Peripheral challenge with double-stranded RNA elicits global up-regulation of cytokine gene expression in the brain. *J Neurosci Res* 87:1381-1388.
- Kuzmin IV, Novella IS, Dietzgen RG, Padhi A, Rupprecht CE (2009) The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution. *Infect Genet Evol* 9:541-553.
- Liu J, Gong N, Huang X, Reynolds AD, Mosley RL, Gendelman HE (2009) Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1-associated neurodegeneration. *J Immunol* 182:3855-3865.
- Lundh B, Kristensson K, Norrby E (1987) Selective infections of olfactory and respiratory epithelium by vesicular stomatitis and Sendai viruses. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13:111-122.
- McCandless EE, Zhang B, Diamond MS, Klein RS (2008) CXCR4 antagonism increases T cell trafficking in the central nervous system and improves survival from West Nile virus encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11270-11275.
- Olival KJ, Daszak P (2005) The ecology of emerging neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11:441-446.
- Papageorgiou IE, Fetani AF, Lewen A, Heinemann U, Kann O (2014) Widespread activation of microglial cells in the hippocampus of chronic epileptic rats correlates only partially with neurodegeneration. *Brain Struct Funct*.
- Reis R (2012) Estudo das alterações neuropatológicas e do comportamento em tarefas hipocampo-dependentes induzidas pela encefalite experimental aguda associada ao vírus Piry. In: Instituto de Ciências Biológicas, vol. MSc, p 71 Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular: Universidade Federal do Pará.
- Reiss CS, Plakhov IV, Komatsu T (1998) Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. *Ann N Y Acad Sci* 855:751-761.
- Simpson RJ, Guy K (2010) Coupling aging immunity with a sedentary lifestyle: has the damage already been done?--a mini-review. *Gerontology* 56:449-458.
- Soffié M, Lamberty Y (1988) Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: Possible interaction with olfactory sensitivity. *Behav Processes* 17:181-190.



- Steel CD, Hahto SM, Ciavarra RP (2009) Peripheral dendritic cells are essential for both the innate and adaptive antiviral immune responses in the central nervous system. *Virology* 387:117-126.
- Teeling JL, Felton LM, Deacon RMJ, Cunningham C, Rawlins JNP, Perry VH (2007) Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. *Brain Behavior and Immunity* 21:836-850.
- Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, Giros B, Mechawar N (2014) Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation* 11:12.
- Travassos da Rosa AP, Turell MJ, Watts DM, Powers AM, Vasconcelos PF, Jones JW, Klein TA, Dohm DJ, Shope RE, Degallier N, Popov VL, Russell KL, Weaver SC, Guzman H, Calampa C, Brault AC, Lemon AP, Tesh RB (2001) Trocara virus: a newly recognized Alphavirus (Togaviridae) isolated from mosquitoes in the Amazon Basin. *Am J Trop Med Hyg* 64:93-97.
- van den Pol AN, Ozduman K, Wollmann G, Ho WS, Simon I, Yao Y, Rose JK, Ghosh P (2009) Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression. *J Comp Neurol* 516:456-481.

Figure Legends

Figure 1. Low-power photomicrography of hippocampus and dentate gyrus from a section immunolabeled with anti-IBA1 antibody to reveal the entire microglial morphology, counterstained with cresyl violet to define layers and limits of CA3. Note that Nissl counterstaining of pyramidal layer readily reveals the frontiers with CA2 showing a conspicuous thickness reduction of that layer in CA2. A straight line connecting the tips of the granular layer of dentate gyrus was used to define the limit between CA3 and the polymorphic layer of dentate gyrus. The grid defined by X and Y-axes established the interval between the square boxes and illustrates the random and systematic sampling approach. The number of boxes placed on each section was proportional to the area of CA3 and a single microglia located inside every box was selected for three-dimensional reconstruction. 640 microglia in total, 80 from each group (20 from each animal) were selected for three-dimensional reconstruction using this sampling strategy.

Figure 2. Low (top) and high (bottom) power photomicrographs from hippocampus and dentate gyrus from aged infected mice at 7dpi (left) and 10dpi (right). Sections were immunolabeled with anti-IBA1 antibody and counterstained with cresyl violet. At 10 dpi microglial morphology from infected mice with enriched environment is closer to the homeostatic microglial morphology than that of infected mice with impoverished environment.

Figure 3. Graphic representations of mean \pm s.e.m. values of of CA3. (*), (+) and (#) indicate p-values of three-way ANOVA pairwise comparisons between control vs infected, impoverished vs enriched environments and adult versus aged mice respectively. IYPy = adult infected mice from impoverished environment, IY = adult control mice from impoverished environment, EYPy = adult infected mice from



enriched environment, EY = adult control mice from enriched environment, IAPy = aged infected mice from impoverished environment, IA = aged control mice from impoverished environment, EAPy = aged infected mice from enriched environment, EA = aged control mice from enriched environment.

Figure 4A. Photomicrographs of CA3 microglia and correspondent three-dimensional reconstructions and dendrograms from mice raised in impoverished environment. Selected microglia show morphometric features close to the mean morphological features of its experimental group. (A) Adult infected (IYPy); (B) adult control (IY); (C) Aged infected (IAPy); (D) Aged control (IA).

Figure 4B. Photomicrographs of CA3 microglia and correspondent three-dimensional reconstructions and dendrograms from mice raised in enriched environment. Selected microglia show morphometric features close to the mean morphological features of its experimental group. (A) Adult infected (EYPy); (B) adult control (EY); (C) Aged infected (EAPy); (D) Aged control (EA).

Figure 5. Graphic representations of cluster dendrogram (A) and discriminant analysis (B) of CA3 microglia applied to all morphological features from microglia of all experimental groups. Note the occurrence of three main classes of microglia distinguished by Euclidian distances above 3000. Two of these clustered microglia corresponded to infected animals and another one corresponded to the microglia from control animals and aged infected mice from enriched environment. Green line indicates Euclidian distances above 1000. In this case five distinct clusters appear, three of which including mainly infected mice and other two with control and aged mice from enriched environment.

Figure 6. Graphic representation of burrowed food as a function of the disease progression in aged mice. Note that all infected aged mice, independently of the environment, showed permanent significant decrease in the amount of burrowed food from 7dpi onwards. IAPy = aged infected mice from impoverished environment, IA = aged control mice from impoverished environment, EAPy = aged infected mice from enriched environment, EA = aged control mice from enriched environment.

Figure 7. Graphic representation of the results in the task of olfactory discrimination. EAPy = aged infected mice from enriched environment (A), EA = aged control mice from enriched environment (B), IAPy = aged infected mice from impoverished environment (C), IA = aged control mice from impoverished environment (D). Note that infected aged mice, independently of the environment, lost permanently their olfactory discrimination from 8dpi onwards.

Figure 8. Graphic representation of the exploratory and locomotor activity in the open field task. Control animals from impoverished environment (IE) and enriched environment (EE) spent significant less time in the center than in the periphery of the arena (A). No significant differences in the time spent in the periphery were detected between aged infected (EAPy) and aged control (AE) mice (B), and only a transitory significant difference in the time spent in the periphery was found at 20dpi in infected and control mice from impoverished environment (C).