



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

NÍVEL: MESTRADO

CINÉTICA DA INFECÇÃO PELO

ARBOVÍRUS PIRY EM MODELO MURINO: A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO ADULTO

ALUNA: ZAIRE ALVES DOS SANTOS

ORIENTADOR: CRISTOVAM WANDERLEY PICAÑO DINIZ

BELÉM - PARÁ

2011

ZAIRE ALVES DOS SANTOS

CINÉTICA DA INFECÇÃO PELO

ARBOVÍRUS PIRY EM MODELO MURINO: A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO ADULTO

**Trabalho apresentado à Universidade Federal do Pará,
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Neurociências e Biologia Celular para
obtenção do grau de mestre.**

Orientador: Cristovam Wanderley Picanço Diniz

BELÉM - PARÁ

2011

ZAIRE ALVES DOS SANTOS

CINÉTICA DA INFECÇÃO PELO

ARBOVÍRUS PIRY EM MODELO MURINO: A RESPOSTA DO HOSPEDEIRO ADULTO

**Trabalho apresentado à Universidade Federal do Pará,
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Neurociências e Biologia Celular para
obtenção do grau de mestre.**

Orientador: Cristovam Wanderley Picanço Diniz

E BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Universidade Federal do Pará (UFPA)

BELÉM - PARÁ

2011

Dedico este trabalho científico:

À minha família.

Ao meu orientador, colaboradores e colegas de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos que conviveram comigo neste período e colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos que participaram dos experimentos mais elaborados até aqueles que simplesmente tornaram a vida em laboratório muito mais agradável com sua presença e convivência. Em especial, ao Prof. Dr. Cristovam Diniz pelo convite em 2001 para fazer parte de sua equipe e aos amigos e colegas Carla Maysa Rego, Renata Reis, Roseane Borner, João Bento e Márcio Braga.

Ao grupo do Instituto Evandro Chagas, especialmente ao Dr. Pedro Fernando Vasconcelos pelo apoio e incentivo e ao Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior pelo apoio, orientação, companheirismo e amizade.

Ao meu querido Raoni por toda a força e compreensão nos momentos de conclusão do trabalho,

Aos familiares, Sônia, Naire, José e Ywilliane, meus maiores incentivadores e colaboradores para todos os desafios da vida.

RESUMO

No presente estudo, um membro do grupo das RNA viroses Sul Americanas encontrado no Brasil, que causa doença febril em humanos e encefalite em camundongos adultos e neonatos, foi selecionado como um modelo para estudar as consequências das encefalites por arbovírus. Em camundongos mantidos em condições padronizadas com acesso livre a água e comida, induziu-se encefalite por via intranasal empregando homogenado cerebral infectado pelo vírus Piry, correlacionando a resposta inflamatória celular quantitativa do hospedeiro na região septal, com os sinais clínicos e a neuroinvasão, utilizando como controle animais que receberam homogenado cerebral não infectado. Animais com três meses de idade receberam volume igual de homogenado cerebral infectante ou de homogenado cerebral normal nas narinas. Em cada um dos oito dias após a infecção, cinco sujeitos da colônia infectada foram sacrificados, perfundidos e processados para detecção dos antígenos virais e microglia. Sujeitos controle foram sacrificados no 5º dia após a inoculação do homogenado cerebral normal para os mesmos marcadores. A encefalite viral induziu ativação microglial e neuroinvasão das células gliais e neurônios, principalmente nas vias olfatórias nas fases iniciais (2 - 4 dpi), mas também incluiu o hipocampo, o cerebelo e núcleos do tronco cerebral mais tarde (5 - 8 dpi). A correlação das estimativas do número de microglias na área septal com os sinais clínicos e a neuroinvasão revelaram que o número e a morfologia daquelas mudou antes da neuroinvasão ter alcançado a região septal e os sinais clínicos aparecerem. Grande variabilidade na intensidade dos sintomas clínicos e na taxa de sobrevivência foi encontrada na variedade de camundongos albinos suíços quando comparados com o previamente descrito na variedade C57Bl6 sugerindo um background genético mais heterogêneo para aquela variedade. Tomados em conjunto nossos resultados prévios e atuais dedicados a investigar a progressão da encefalite induzida pelo vírus Piry no camundongo albino suíço pode abrir um novo campo de investigação das bases genéticas, anatômicas e imunes acerca das encefalites sub-letais tropicais.

Palavras chave: arbovírus, camundongo, SNC, inflamação.

ABSTRACT

In the present report, a member of a group of RNA South American viruses found in Brazil, that causes febrile disease in humans and encephalitis in neonate and adult murine models, was selected as a model to study encephalitis outcomes in adult albino Swiss mice. In mice housed under standard conditions with free access to water and food, we induced viral encephalitis by intranasal inoculation of Piry virus-infected brain homogenate and correlated neuropathological features. We quantified the cellular inflammatory response in the septal region using a stereologically based unbiased method with clinical signs and neuroinvasion, comparing the outcomes with those of animals inoculated with uninfected brain homogenate. Three-month-old female mice maintained in standard environment received an equal volume of Piry virus infected or normal brain homogenates into the nostrils. From the 1st to 8th days post-instillation (dpi), five subjects from the infected colony were fixed and processed to detect viral antigens and microglia. Control subjects were sacrificed in the 5th dpi and processed for the same markers. After Piry virus encephalitis induced microglial activation and neuroinvasion of glial cells and neurons mainly in the olfactory pathways early in the disease (2 - 4 dpi), but also included hippocampus, cerebellum and brain stem nuclei later on (5 - 8 dpi). The correlation of the host cellular inflammatory quantitative response in the septal area with clinical signs and neuroinvasion, revealed that the number and the morphology of microglia changed early in the disease before neuroinvasion had reached the septal region and clinical signs had appeared. Great variability in clinical symptoms intensity and survival rate were found in the outbred albino Swiss mice strain as compared with previous report in the inbred C57Bl6 strain suggesting less isogenic background. Taken together, our previous and present report dedicated to investigate Piry virus encephalitis progression in the outbred albino Swiss mice strain may open a new field of investigation of the genetics, anatomical and immune substrates of tropical sublethal arbovirus encephalitis.

Key words: arbovirus, mice, CNS, inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A- Ilustração dos planos de cortes eleitos para a representação esquemática da distribuição da marcação antigênica para o vírus Piry. Fonte: Mouse Brain Atlas http://www.mbl.org/atlas232/atlas232_frame.html.

Figura 1B- Distribuição esquemática dos antígenos virais do arbovírus Piry no segundo dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

Figura 1C- Distribuição esquemática dos antígenos virais do arbovírus Piry no terceiro dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

Figura 1D- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no quarto dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

Figura 1E- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no quinto dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

Figura 1F- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no sexto dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

Figura 1G- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no sétimo dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

Figura 1H- Ausência de antígenos do arbovírus Piry no oitavo dpi.

Figura 2- Alvos celulares virais. A-F são fotomicrografias de células cujas morfologias são compatíveis com a de neurônios, astrócitos e microglias. Baixo (G) e médio aumento (H-K) de parte do lobo olfatório e circunjacências ilustrando forte imunomarcagem do trato olfatório. Note que a região periventricular também é fortemente imunomarcada e os componentes celulares nessa região lembram os macrófagos (L).

Figura 3- Fotomicrografias em baixo e grande aumento ilustrando a presença ou ausência de antígenos virais e distribuição espacial de microglias na região septal. Note que no 3º dpi ainda que não haja imunomarcagem para antígenos virais, a morfologia microglial se distingue claramente da do animal controle em contraste com o 7º dpi onde a morfologia microglial parece quiescente e já parece ter ocorrido o clearance viral. Em situação intermediária, encontra-se a distribuição e a morfologia da microglia no 5º dpi onde ainda se detecta a presença dos antígenos virais.

Figura 4- Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferencial não homogênea. Fonte: (GARDELLA et al., 2003).

Figura 5- Fotomicrografia de secções anatômicas seriais para definição da área de interesse. Adaptado de Borner et al., 2011.

Gráfico 1- Comparação da contagem de microglias totais em animais controle e infectados 3, 5 e 7dpi. Os animais infectados apresentaram elevação na quantidade de microglias em relação ao grupo controle (*= $p < 0,01$). No grupo de 7dpi houve queda na quantidade de microglias quando comparada aos grupos de 3 e 5dpi (# = $p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados de observações diárias dos animais infectados com o vírus Piry, avaliação do número de animais sintomáticos e moribundos em cada tempo de sobrevida.

Tabela 2- Imunohistoquímica para antígenos virais anti-Piry em diferentes tempos de sobrevida, distribuição e avaliação semiquantitativa da intensidade da marcação antigênica e sinais clínicos.

Tabela 3- Número total de microglias em cada animal (N) e o coeficiente de erro (CE) para estimativas do número de microglias na região septal de fêmeas adultas de camundongos suíços, 3, 5 3 7 dpi.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA3.....	Corno de Amon 3
CE2	Coeficiente de Erro ao quadrado
CV2	Coeficiente de variação ao quadrado
CVB	Coeficiente de Variação Biológica
DAB	Diaminobenzidina
dpi	Dias Pós Inoculação
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato de sódio -salina
PBST	Tampão fosfato de sódio-salina com triton
GND	Glucose oxidase/Níquel/DAB
IEC	Instituto Evandro Chagas
IN	Via Intranasal
N	Número total de neurônios
pH	Potencial Hidrogeniônico
SNC	Sistema Nervoso Central
Ssf	“section sampling fraction” = secções contadas/total de secções
Tsf	“tissue sampling fraction” = altura bloco/espessura da secção

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	Arboviroses e encefalites virais	12
1.2.	Ativação microglial e encefalite viral	16
1.3.	O Uso do fracionador optico para estimativas numéricas sem vies	17
1.4.	A região septal	19
2.	OBJETIVOS	20
2.1.	Objetivo geral	20
2.2.	Objetivos específicos	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1.	Animais e infecção	21
3.2.	Perfusão e microtomia	22
3.3.	Imunohistoquímica para detecção de antígenos virais anti-Piry e para detecção de microglias anti- IBA-1	23
3.4.	Fotomicrografia e processamento de imagens	24
3.5.	Procedimentos estereológicos	25
3.6.	Análise estatística	27
4.	RESULTADOS	28
4.1.	Curso temporal dos sinais clínicos	28
4.2.	Áreas, células alvo e sequência temporal da neuroinvasão	29
4.3.	Neuroinvasão e sinais clínicos	35
4.4.	Resposta inflamatória inata	35
4.5.	Cinética quantitativa da resposta inflamatória	37
5.	DISCUSSÃO	41
5.1.	Neuroinvasão e resposta inflamatória inata	42
5.2.	Limitações técnicas não estereológicas	44
6.	CONCLUSÕES	48
7.	BIBLIOGRAFIA	49
	ANEXO A	59

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas transmitidas pelo ar e pela água são as mais facilmente disseminadas e de distribuição mais ampla quando comparadas àquelas transmitidas por vetores, com menor disseminação em função da ausência daqueles em algumas regiões do planeta. Entretanto, com as mudanças climáticas em associação à capacidade dos patógenos de se adaptarem a outros vetores, esse cenário de disseminação das doenças infecciosas está mudando e muitas delas se tornaram ameaças globais (BEZIRTZOGLU, DEKAS e CHARVALOS, 2011)

Artrópodes hematófagos são responsáveis pela transmissão de uma variedade de patógenos incluindo bactérias, vírus e protozoários entre hospedeiros vertebrados causando doenças que podem ser fatais como a malária, a dengue, a tripanossomíase, etc. Recentemente, várias doenças virais que são transmitidas por vetores se transformaram em sérias ameaças globais, sendo exemplos a encefalite japonesa, a gripe aviária (H5N1), a gripe suína (H1N1).

1.1. ARBOVIROSES E ENCEFALITES VIRAIS

Os arbovírus (do inglês “ARthropod BORne VIRUS”) reúnem um conjunto de espécies virais que produzem doença em humanos de larga importância epidemiológica no mundo inteiro. Todas as arboviroses circulam entre animais selvagens e muitas delas causam doenças em humanos ou em animais domésticos de importância econômica, após a picada de insetos infectados. Os arbovírus são mantidos na natureza em hospedeiros vertebrados, incluindo mamíferos, aves, anfíbios, répteis, assim como em hospedeiros invertebrados, como mosquitos, flebotomíneos, carrapatos, maruins, etc. (MELLOR, BOORMAN e BAYLIS, 2000). As espécies reunidas nesse grupo podem se multiplicar nos tecidos dos artrópodes e serem transmitidas de um artrópode para outro por via vertical, um importante mecanismo para sua manutenção na natureza. Como o termo arbovírus se refere a uma classificação baseada no ciclo viral e sua relação com os artrópodes, não sendo incluído como tal na classificação taxonômica de vírus, diferentes famílias e diferentes ordens podem ter representantes entre os arbovírus. Para

revisão de sua importância epidemiológica passada e presente ver (WEAVER e REISEN, 2010).

É significativa a incidência de arboviroses em países em desenvolvimento como o Brasil (TRAVASSOS DA ROSA, VASCONCELOS e TRAVASSOS DA ROSA, 1998), onde mais de 500.000 casos de dengue são anualmente reportados (FAUCI, 2001). Na Amazônia Brasileira, em particular, a elevada incidência de arboviroses parece estar associada ao manejo inadequado contínuo dos ecossistemas, contribuindo para a emergência e re-emergência de várias dessas infecções, algumas se tornando importantes problemas de saúde pública regional e nacional (VASCONCELOS et al., 1991, VASCONCELOS et al., 1997, VASCONCELOS et al., 2001b). Cerca de 200 diferentes espécies de arbovírus, já foram identificadas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) até o momento, entre as mais de 10.000 cepas de vírus isoladas de seres humanos, insetos hematófagos, vertebrados-sentinela e animais silvestres. Tais números são motivo de grande preocupação pelo fato adicional do que pouco é conhecido acerca desses vírus, exceto pelas informações básicas produzidas pelo IEC sobre o método de isolamento, capacidade de infectar animais de laboratório e de produzir infecções agudas. Deste modo, continua desconhecido o real envolvimento de muitos desses arbovírus em doença humana, pois apenas 32 deles já foram descritos como tal. Dentre essas arboviroses, destacam-se quatro (Dengue, Febre amarela, Oropouche e Mayaro) que são muito importantes para a saúde pública, por serem doenças graves e com potencial para gerar epidemias de considerável impacto econômico e social (VASCONCELOS et al., 2001a, WHITLEY e GNANN, 2002). Associadas a tais doenças, estão as encefalites virais sub-letais. As encefalites sub-letais após infecções virais têm sido reconhecidas como indutoras de alterações comportamentais e imunológicas, representando uma proporção significativa das deficiências neurológicas incapacitantes, principalmente em países pobres (JOHNSTON e HAUSER, 2008). Nesse contexto, as infecções virais emergentes do Sistema Nervoso Central (SNC), produzidas por RNA-vírus são as mais frequentes e muitas delas causam doença neurológica (OLIVAL e DASZAK, 2005) com o agravante de que os RNA vírus podem sofrer mutações rapidamente, impondo desafios sérios tanto para o sistema imune quanto para a produção de vacinas e produção de medicamentos anti-virais.

Os RNA vírus podem ser classificados de acordo com o sentido da polaridade de seu RNA em vírus com RNA com sentido negativo (negative-sense), vírus com RNA com sentido positivo (positive-sense) ou com sentido duplo (ambisense) e de acordo

com o número de fitas ou cadeias, em simples e dupla. Os vírus com seu RNA de polaridade positiva, devido a sua similaridade com o mRNA, podem sofrer tradução imediatamente na célula hospedeiro enquanto que aqueles com RNA de polaridade negativa são complementares ao mRNA e precisam ser primeiro convertidos em RNA de polaridade positiva por uma RNA polimerase antes da tradução. Assim o RNA purificado de um RNA vírus de sentido positivo pode causar infecção diretamente enquanto que o de sentido negativo não é infectante em si mesmo devendo ser transcrito antes de poder causar infecção (TAO e YE, 2010).

Dentre as ordens de interesse médico contidas no grupo dos RNA vírus está a *Mononegavirales*, caracterizada por possuir genoma constituído por RNA não segmentado de sentido negativo. Essa ordem possui vários vírus associados à doenças humanas, como exemplo o influenza A, o vírus do sarampo, vírus ebola, vírus da estomatite vesicular (VSV) e o vírus da raiva (KUZMIN et al., 2009). Possui quatro famílias, dentre as quais a Rhabdoviridae é de particular interesse para o presente trabalho.

A família Rhabdoviridae é, portanto, composta por espécies virais classificadas como possuindo cadeias simples de RNA com sentido negativo. Essa família consiste em mais de 185 diferentes vírus isolados de plantas e animais, são vírus envelopados e têm a peculiar característica de formato de bala de revólver. Essa morfologia distinta separa os rbdovírus de outros vírus da ordem *Mononegavirales*. A família Rhabdoviridae possui seis gêneros: quatro deles relacionados a patologias animais (Lyssavirus, Vesiculovirus, Ephemerovirus e Novirhabdovirus) e dois relacionados a patologias vegetais (Cytorhabdovirus e Nucleorhabdovirus).

Em trabalho anterior, estudamos sete das espécies amazônicas da família Rhabdoviridae, buscando induzir encefalites experimentais a partir de inoculação viral intranasal (IN) de camundongos neonatos, a saber: Jurona, Itacaiunas, Curionópolis, Marabá, Piry, Carajás e Cocal. Em todos os testes foi observada neuroinvasão e quase todos os animais evoluíram para a morte, diferindo em proporção e tempo de sobrevivência. (GOMES-LEAL et al., 2006). Outras espécies da família Rhabdoviridae também já foram usadas com sucesso para induzir encefalite experimental em camundongos (VAN DER POEL et al., 2000, TRAVASSOS DA ROSA et al., 2002, IWASAKI et al., 2004). Por conta do fato de que o VSV tem patogenicidade humana limitada, ele tem sido usado como um modelo para investigação *in vitro* e *in vivo* tanto das adaptações sofridas pelo patógeno quanto das respostas do hospedeiro à infecção pelas

rhabdoviroses (REISS, PLAKHOV e KOMATSU, 1998, VAN DEN POL et al., 2009). O processo de neuroinvasão viral já foi descrito para essa espécie e envolve várias etapas, incluindo replicação no sítio primário de infecção, entrada e disseminação no sistema nervoso central (SNC), resposta imune do hospedeiro e lesão tecidual (CROTTY et al., 2002, FAZAKERLEY, 2004, REMPEL et al., 2004).

A cinética da resposta inflamatória inata no sistema nervoso central infectado pelo VSV foi previamente descrita no camundongo C57Bl6J, bem como a distribuição dos antígenos virais determinada em diferentes janelas temporais, tendo sido encontrada forte ativação microglial e reatividade astrocítica (CHRISTIAN et al., 1996). Entretanto, apesar de serem conhecidos os elementos ativados da resposta inflamatória durante a progressão da doença (CHRISTIAN et al., 1996, CHAUHAN et al., 2010), sua quantificação sem viés em áreas específicas durante o processo de neuroinvasão está longe de ser conhecida em detalhe.

No presente trabalho, quantificamos a resposta inflamatória do hospedeiro adulto durante o curso temporal da encefalite induzida por um RNA vírus da família Rhabdoviridae, o arbovírus Piry. Essa espécie é encontrada no Brasil (MARRIOTT, 2005, WEAVER, 2006) e causa doença febril em humanos caracterizada por início súbito, com cefaléia, lombalgia e mialgias, durante um ou dois dias, podendo ser diagnosticada através de testes sorológicos (BERGE, 1975, PINHEIRO, 1981, FIGUEIREDO, DA ROSA e FIORILLO, 1985, VASCONCELOS et al., 2001b).. Estudos prévios também revelaram que o arbovírus Piry induz encefalite quando inoculado experimentalmente em modelo murino adulto e neonato (DA CRUZ, 1981, WILKS e HOUSE, 1984, GOMES-LEAL et al., 2006, DE SOUSA et al., 2011).

O vírus Piry foi isolado em 1960, em Belém do Pará, Brasil, a partir de material proveniente das vísceras de um marsupial *Philander opossum* (BERGE, 1975). Estudos sorológicos revelaram que esse Rhabdovírus (BERGOLD e MUNZ, 1970) pertencente ao grupo antigênico dos Vesiculovírus (BERAN, 1994) e tem prevalência na Amazônia entre 4% e 17% em diferentes populações (PINHEIRO et al., 1974).

Em trabalho prévio de co-autoria (DE SOUSA et al., 2011), descrevemos as alterações neuropatológicas relacionadas à encefalite não letal pelo arbovírus Piry documentando as alterações da matriz extracelular e a resposta inflamatória nas fases tardias da infecção em diferentes dias pós-infecção (dpi), a saber: 8 dpi, 20 dpi e 40 dpi. No presente trabalho, investigamos o curso temporal da infecção promovida pelo vírus Piry no cérebro de camundongos adultos fêmeas em fases mais precoces da infecção (de

dois a oito dpi, diariamente) completando os estudos da cinética viral, além disso, quantificamos a resposta inflamatória microglial do hospedeiro. Utilizamos para isso a imunomarcção para os antígenos virais no SNC e a análise estereológica de microglias imunomarcadas na região septal em camundongos fêmeas adultas da variedade albina suíça de 12 semanas de idade. Tendo em vista a quantificação da resposta inflamatória inata limitada a microglia é de interesse rever achados anteriores relativos à ativação microglial e as encefalites virais.

1.2. ATIVAÇÃO MICROGLIAL E ENCEFALITE VIRAL

Células microgliais são fagócitos residentes no SNC, que contribuem tanto para a imunidade inata quanto para a imunidade adaptativa do tecido nervoso. Entretanto, a microglia parece ter também um relevante papel durante a função normal do sistema nervoso adulto (ZIELASEK e HARTUNG, 1996). As microglias são descritas ainda como o “terceiro elemento” do SNC (CAJAL, 1913), essa definição se aplica a todas as células que apresentam morfologia diferente de um neurônio (“primeiro elemento”) e de astrócitos (“segundo elemento”) (GARDEN e MOLLER, 2006).

As células microgliais, portanto, 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 que ocorre no desenvolvimento normal (ZIELASEK e HARTUNG, 1996).

A ativação microglial tem um importante papel na patogênese de desordens inflamatórias experimentais, mas os mecanismos moleculares dessa ativação ainda não estão claros (RANSOHOFF e PERRY, 2009, PERRY, NICOLL e HOLMES, 2010). Trabalhos recentes sugerem que a regulação da função da microglia pode ser uma possível estratégia terapêutica na prevenção de disfunções neurológicas em uma variedade de doenças do SNC, especialmente as doenças crônicas (GARDEN e MOLLER, 2006, PERRY, NICOLL e HOLMES, 2010) e neurodegenerativas, como esclerose múltipla, além de infecções bacterianas e virais do sistema nervoso (ZIELASEK e HARTUNG, 1996, PERRY, NICOLL e HOLMES, 2010).

Mudanças na morfologia e na quantidade de microglias têm sido documentadas previamente e são associadas à sua ativação. Essas alterações morfológicas para uma aparência amebóide com processos citoplasmáticos encurtados e um corpo celular arredondado atravessam três estágios de ativação: inicial, intermediário e avançado que são acompanhados pelo aumento da expressão de genes envolvidos em respostas imunes (ZIELASEK e HARTUNG, 1996, PERRY, NICOLL e HOLMES, 2010). Além da mudança morfológica, a ativação microglial também é caracterizada pela indução da liberação de várias moléculas, tais como citocinas, radicais livres e óxido nítrico (STREIT e KREUTZBERG, 1988, BECHMANN e NITSCH, 1997, RAIVICH et al., 1999, STREIT, WALTER e PENNELL, 1999). Essa ativação da célula microglial pode ocorrer em resposta a variados estímulos, tais como lesões, isquemia e processos inflamatórios, levando a microglia a assumir um fenótipo ativado associado à proliferação, migração para o local da lesão, fagocitose das células infectadas e em processo de morte celular e liberação de fatores neurotóxicos e neurotróficos (POWER e PROUDFOOT, 2001).

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, WINBLAD e MOHAMMED, 2002). 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, WINBLAD e MOHAMMED, 2002). Outros estudos sugerem que as prostaglandinas, mais que as citocinas, possuem um papel-chave na via de comunicação do sistema imune com o cérebro, no processo inflamatório (TEELING et al., 2007).

1.3. O USO DO FRACIONADOR ÓPTICO PARA ESTIMATIVAS NUMÉRICAS SEM VIÉS EM MICROSCOPIA ÓPTICA

A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como menores, maiores, mais largas, menos frequentes, mais frequentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (SCHMITZ e HOF, 2005). Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e

expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes apresentam resultados controversos que se devem a suposições prévias acerca do tecido e da geometria das células e de suas distribuições no plano da secção (GEINISMAN et al., 1995, MAYHEW e GUNDERSEN, 1996). Esses estudos quantitativos eventualmente introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (MAYHEW e GUNDERSEN, 1996, HOWARD, 2005), confocal (PETERSON, 1999, KUBINOVA e JANACEK, 2001) ou eletrônica (FIALA e HARRIS, 2001, NYENGAARD e GUNDERSEN, 2006). A análise microscópica em qualquer nível é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos, particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto, é necessário considerar que, se um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse, é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original será de fato analisada em detalhe (HOWARD, 2005, SCHMITZ e HOF, 2005). Para contornar tais vieses empregam-se técnicas estereológicas que estimam o número total dos objetos contidos em uma dada região de interesse através de coleta de informação aleatória e sistemática, multiplicando-se o número de elementos de interesse registrados pelos valores de probabilidade da amostra e.g. (WEST, 2002). O termo sem viés é utilizado para definir sistemas de amostragem que são independentes das propriedades do tecido onde as dimensões da sonda (caixa de contagem) e os parâmetros amostrais a ela associados (número e intervalo entre elas) são definidos a priori, desprezando-se a coleta de dados acerca do tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (GLASER e GLASER, 2000). Assim, os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas, sem conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado. Dentre todos os procedimentos utilizados para estimar o número total de objetos de interesse dentro de uma determinada região ou camada, o fracionador óptico é o que tem sido usado com mais frequência, pois combina as propriedades da sonda tri-dimensional para contagem dos elementos de interesse (o dissecador óptico) com o sistema de amostragem sistemática e aleatória (o fracionador) removendo vieses amostrais e pressuposições (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991). Essa metodologia foi adotada no presente trabalho e sua utilização para fins práticos é descrita no capítulo de métodos.

1.4. A REGIÃO SEPTAL

A metodologia estereológica adotada no presente trabalho para estimar a resposta inflamatória inata foi aplicada à região do *septum*. Essa região foi eleita porque que recebe projeções diretas do sistema olfatório através da estria olfatória e em trabalho anterior já havíamos demonstrado o comprometimento daquela área, após encefalite induzida por instilação nasal do arbovírus Piry (DE SOUSA et al., 2011). De fato a região septal, é também conhecida como área olfativa medial, situando-se abaixo da *rostrum* do corpo caloso e na frente da *lamina terminalis*, sendo composta por neurônios de tamanho médio organizados em núcleos denominados de núcleos septais medial, lateral e posterior. Os núcleos septais recebem aferências principalmente do hipocampo e do subículo do giro parahipocampal e da porção pré-comissural do fórnix. A região septal não é uma estrutura autônoma com tarefa solitária, desempenhando uma função integradora em associação com outras áreas do sistema límbico. Os núcleos septais recebem e enviam conexões para o bulbo olfatório, hipocampo (especialmente de CA3), amígdala, hipotálamo, mesencéfalo, habênula, giro do cíngulo e tálamo. Conecta estruturas límbicas ao hipotálamo e ao tronco encefálico, principalmente por meio da formação hipocampal (VON CRAMON e MULLER, 1998). Parece desempenhar função importante em tarefas hipocampo-dependentes como aprendizado e memória, assim como no comportamento ansioso, sistema cerebral de recompensa e sensações autonômicas em situações aversivas (SHEEHAN, CHAMBERS e RUSSELL, 2004, FERNANDES, TAVARES e CORREA, 2005).

A região septal possui densa conexão com as vias olfatórias, recebe fibras da estria olfatória medial e projeta para o hipocampo, hipotálamo e tronco cerebral (RAWLINS, FELDON e GRAY, 1979, BREER, FLEISCHER e STROTMANN, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a sequência de neuroinvasão promovida pelo vírus Piry e a cinética quantitativa da resposta inflamatória inata no sistema nervoso central do hospedeiro em modelo murino adulto por metodologia estereológica sem viés.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Identificar a sequência temporal da neuroinvasão promovida pelo vírus Piry em modelo murino por imunohistoquímica para os antígenos virais nos tempos de sobrevivência de 2 dpi, 3 dpi, 4 dpi, 5 dpi, 6 dpi, 7 dpi e 8 dpi.

b) Estudar a cinética da resposta inflamatória inata do hospedeiro através da análise estereológica de seções da região septal do SNC submetidas à imunohistoquímica para marcador de microglia (IBA-1) nos tempos de sobrevivência de 3 dpi, 5 dpi e 7 dpi.

c) Investigar a possível correlação entre a severidade dos sinais clínicos apresentados pelos animais e os resultados da imunomarcagem seletiva para os antígenos virais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este foi um estudo experimental em camundongos adultos fêmeas da espécie *Mus musculus*, da variedade albina suíça realizado no período de março de 2009 a setembro de 2011, no Laboratório de Neuroanatomia Funcional no Instituto de Ciências Biológicas e Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará (UFPA), em colaboração com o Departamento de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC) e com a Unidade de Microscopia Eletrônica (IEC).

O protocolo de estudos foi submetido e recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação – do HUIBB (Anexo A).

Todos os procedimentos foram realizados em cabines de fluxo laminar classe II B2 as quais 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 e os executores usaram Equipamentos de Proteção Individual (EPI).

3.1. ANIMAIS E INFECÇÃO

Oitenta camundongos suíços albinos (*Mus musculus*) fêmeas com 12 semanas de idade foram obtidos do biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) e acomodados em gaiolas com cinco animais em cada e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22° C) com ciclos de doze horas de iluminação e interrupção, começando às sete horas da manhã.

Os homogenados cerebrais contendo os vírus foram obtidos a partir de camundongos previamente infectados com o vírus Piry fornecidos pela Seção de Arbovirologia e Febre Hemorrágicas seguindo o modelo de Xiao et al. 2001. Cada cérebro (0,2g) foi macerado em 1,8 ml de tampão fosfato 0.1M pH 7.2 – 7.4 (PBS) contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Logo após a mistura foi

centrifugada à 10.000 G durante 15 minutos à temperatura de 4°C. A suspensão produzida foi alíquotada em microtubos de 0,5ml e mantida a -70°C até seu uso.

A titulação viral foi feita pela inoculação intra-cerebral de 0,2ml de suspensão viral em diferentes diluições em escala de 10 em PBS. A dose letal mediana (LD50) inicial foi calculada pelo método de Reed e Muench. A LD50/20µl inicial foi de 8.0 Log10. A concentração viral eleita neste trabalho, a cada momento, foi baseada na necessidade de obter uma dose não letal para toda a colônia e que fosse capaz de produzir uma encefalite crônica não fatal.

Foram administrados por via intranasal (IN) 20µl de suspensão viral em solução de Tampão Fosfato (PB), 0.1M, pH 7.2-7.4 contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) em 45 camundongos e os animais foram observados diariamente. A dose efetiva a cada grupo de experimentos variou em função da presença de sinais clínicos evidentes e da ocorrência de óbitos em proporção menor do que 50%.

Um grupo controle foi constituído por 35 animais que receberam 20 µl de homogenado de cérebro de camundongo neonato não infectado. Como esperado, alguns animais morreram entre o quarto e o sétimo dia pós-infecção viral. No 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7° e 8° dias pós-infecção cinco dos animais infectados e cinco dos controles foram perfundidos.

3.2. *PERFUSÃO E MICROTOMIA*

Os camundongos foram anestesiados com Avertina, 0,15ml/5g de peso corporal (FLECKNELL, 1987; GREEN, 1982), por via intra-peritoneal e perfundidos por via intra-cardíaca com solução salina heparinizada e paraformaldeído 4% utilizando-se uma bomba de infusão. Após a craniotomia, os cérebros foram mantidos em paraformaldeído 2% por 24 horas e depois seccionados no plano coronal na espessura de 70µm em vibrátomo (MICROM, modelo HM 650 V). As secções obtidas de cada cérebro foram divididas em quatro amostras igualmente representativas de todo o cérebro para posterior processamento por imunohistoquímica.

3.3. *IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS (ANTI-PIRY) E PARA DETECÇÃO DE MICROGLIAS (ANTI- IBA-1)*

Foi feita imunohistoquímica anti-Piry e anti-IBA-1, um marcador de macrófagos e de microglias, em amostras de todos os cérebros infectados e não infectados (controles).

Imunohistoquímica anti-Piry:

- 1- Lavagem em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7.2-7.4 por cinco minutos;
- 2- Ácido bórico 0,2M pH 9.0 a 60°C por 1 hora;
- 3- Peróxido de hidrogênio 3% em metanol 15 minutos;
- 4- Lavagem em PBS por cinco minutos (cinco vezes);
- 5- Bloqueio de IgG (IgG Blocking Reagent- bloqueador específico do kit Mouse-on-Mouse Immunodetection- kit M.O.M., Vector Laboratories, USA) seguindo instruções do fabricante por 1 hora;
- 6- Solução de concentrado de proteína (kit M.O.M.) em PBS por cinco minutos;
- 7- Anticorpo primário- Soro homólogo hiperimune anti-Piry 1:30 v/v (produzido e fornecido pelo Instituto Evandro Chagas) por 72 horas;
- 8- Lavagem em PBS por cinco minutos (cinco vezes);
- 9- Anticorpo secundário anti- IgG de camundongo (kit M.O.M.) 1:300 por 12 horas;
- 10- Lavagem em PBS por cinco minutos (cinco vezes);
- 11- Complexo avidina-biotina em PBS por uma hora;
- 12- Lavagem em PBS por cinco minutos (cinco vezes);
- 13- Tampão acetato 0,2M pH 6.0 por cinco minutos;
- 14- Revelação na solução GND (Níquel, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate-DAB, cloreto de amônio, β .d. glucose e glucose oxidase);
- 15- Reação interrompida em tampão fosfato PB 0,1M.

Imunohistoquímica anti-IBA-1:

1. Ácido bórico 0,1M pH 9.0 a 60°C por 1 hora;
2. Lavagem em tampão tris-salina Trinton 5% pH 7,6 por cinco minutos (três vezes);
3. Lavagem em tampão tris-salina (TBS) pH 7,6 por dois minutos (três vezes);
4. Solução de caseína 10% v/v por uma hora;
5. Lavagem em TBS por dois minutos (três vezes);
6. Anticorpo primário anti-IBA1 (anti-Iba-1, Rabbit- Wako Laboratories) 5µL/2,5ml de Tris-salina por 72 horas;
7. Lavagem em TBS por dois minutos (três vezes);
8. Anticorpo secundário Biotinilated Anti-Mouse IgG/ Anti-Rabbit IgG (H+L) made in horse (Vector Laboratories, USA) 10µl para 2,5ml de caseína 10% durante doze horas;
9. Peróxido de hidrogênio 3% v/v em tris-salina por quinze minutos;
10. Lavagem em TBS por dois minutos (três vezes);
11. Complexo avidina-biotina em tris-salina por uma hora;
12. Lavagem em TBS por dois minutos (três vezes);
13. Tampão acetato 0,2M pH 6.0 por cinco minutos;
14. Revelação na solução GND;
15. Reação interrompida em tampão Tris 0,1M.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas as quais secaram em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida foram desidratadas e recobertas com Enthelan® e lamínula.

3.4. FOTOMICROGRAFIA E PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Para a análise qualitativa das alterações neuropatológicas, foram obtidas fotomicrografias utilizando-se microscópio óptico Nikon (Optiphot-2, NY, USA) acoplada à câmera digital Microfire (Microfire, Optronics, CA, USA). As regiões fotografadas foram escolhidas de forma equivalente para cada grupo experimental e ilustram resultados que mais se aproximavam da média qualitativa de cada grupo.

Foi comparada a morfologia das células mais prevalentes em cada grupo, levando em conta o tamanho do corpo celular, o comprimento e ramificações dos braços e a proporção entre o comprimento dos braços e o tamanho do corpo celular.

O brilho e o contraste das imagens foram ajustados através do software Adobe Photoshop 7.0.1 (San Jose, CA, USA).

3.5. PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS

O procedimento de contagem foi iniciado com a geração automática de caixas de contagem virtuais pelo programa Stereo Investigator em cada um dos pontos da matriz de contagem que representam intersecções da sonda estereológica com o plano onde estava situada a fatia. Para isso, o experimentador alimenta o programa definindo as dimensões da caixa, da matriz de contagem e da fração amostral de secções. A escolha dessas dimensões e da fração amostral foi feita em ensaio preliminar (por tentativa e erro) até que o coeficiente de erro de uma fatia individual fosse adequado para obter resultados médios para o conjunto de secções e tivesse um baixo coeficiente de erro (<0.05). Em cada caixa de contagem foram marcados os objetos de interesse (microglias), esses objetos marcados em cada caixa geraram informações para o programa acerca do número e da posição dos elementos contidos em cada caixa. A partir dessas informações colhidas sistematicamente na fração de secções eleitas para contagem, o programa estimou o número esperado de objetos de interesse na estrutura inteira.

Todas as secções histológicas analisadas tiveram a delimitação da região septal, seguida de sua digitalização diretamente a partir das secções utilizando uma objetiva de pequeno aumento, 4× em um microscópio Optiphot-2 (Nikon, Japan) equipado com uma platina motorizada (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Este sistema foi acoplado a um computador usado para armazenar e analisar as coordenadas dos eixos x, y, and z de pontos digitalizados. Foi utilizado para as contagens um microscópio óptico de campo claro com objetiva PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2µm; Nikon, Japan), com vídeo-câmera (Microfire, Optronics), que permitiu o registro e transporte dos arquivos de imagem para um computador onde softwares residentes realizaram o processamento. O programa estimou o número total de células baseado na

probabilidade amostral obtida através de contagens aleatórias e sistemáticas previamente mencionadas.

Todas as estimativas estereológicas foram iniciadas com a delimitação, no plano horizontal, da região de interesse, onde os limites da região septal eram inequívocos. Em cada local de contagem, a espessura da secção foi cuidadosamente avaliada com a objetiva de grande aumento e o foco fino do microscópio foi usado para definir a posição no eixo z de cada célula marcada. Devido à variação de espessura e da distribuição de células em cada secção, o número total de objetos de interesse foi contado em todas as camadas celulares que entraram em foco em cada local de contagem, portanto a estimativa do número de células foi ponderada tomando em consideração a espessura do corte em cada local.

Foram contados todos os objetos que entraram em foco dentro da caixa de contagem e adicionados ao número total de objetos marcados, desde que se encontrassem inteiramente dentro da sonda estereológica de contagem ou cruzando o plano permitido, sem tocar o plano proibido (Gundersen and Jensen 1987). O software se encarrega de distribuir cada caixa de contagem de forma aleatória e sistematicamente dentro de uma grade definida pelo experimentador. As grades de contagem foram adaptadas para atingirem um coeficiente de erro aceitável (CE). Para isso foi adotado o coeficiente de Scheaffer previamente utilizado e validado por outros autores (Glaser and Wilson 1998). O nível de erro aceitável para as estimativas estereológicas foi definido como a razão entre o erro intrínseco introduzido pela metodologia e o coeficiente de variação da amostra (Glaser and Wilson 1998; Slomianka and West 2005). O coeficiente de erro que expressa a precisão na estimativa do número de células, foi considerado apropriado neste trabalho quando atingiu um valor de $CE \leq 0.05$, porque a variância introduzida pelo procedimento contribui pouco para a variância observada no grupo (Glaser and Wilson 1998; Slomianka and West 2005). Os parâmetros experimentais estabelecidos em experimentos pilotos foram aplicados uniformemente a todos os animais.

Em nosso protocolo, cuidado especial foi tomado para evitar contagens repetidas do mesmo objeto nos diferentes planos de foco. Para isso repetiu-se o procedimento de focalização várias vezes, avançando e recuando nos diferentes planos ao longo do eixo Z em cada caixa, particularmente quando co-existiam muitas elementos na mesma caixa.

A estimativa do número total de objetos de interesse dentro da região de interesse foi obtida através do método do fracionador óptico, multiplicando-se o número de microglias contadas dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra.

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

Onde:

N – número total de objetos (microglias)

ΣQ – número de objetos contados

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

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

Foram adotados os seguintes parâmetros estereológicos para a contagem de microglias na região septal:

Caixa de contagem: 40x40 (μm^2); Matriz de contagem: 100x100(μm^2); Espessura da caixa: 20(μm); Secções contadas por animal: cinco (5).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima daquele (GLASER & WILSON, 1998).

Assim o presente trabalho deu preferência ao fracionador óptico como método estereológico e ao coeficiente de Scheaffer como instrumento de medida do erro metodológico.

A contagem total de microglias nos animais infectados foi feita nos tempos de sobrevivência de 3, 5 e 7dpi e os resultados comparados com animais controle instilados com homogenado cerebral não infectado. Esses três tempos de sobrevivência foram selecionados com base em resultados da observação de sinais clínicos no grupo infectado, levando em consideração o início da lesão cerebral, o dia de maior detecção de antígenos e o dia em que os sinais clínicos apresentados foram mais exuberantes. Utilizou-se o teste ANOVA- um critério - Bonferroni, a priori, com nível de confiabilidade em 95 ou 99% ($p < 0.05$ ou $p < 0.01$).

4. RESULTADOS

4.1. CURSO TEMPORAL DOS SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos, a saber: pelo eriçado, hiporexia, astenia, paresia uni ou bilateral de membros inferiores, rigidez de coluna (principalmente na região torácica), rigidez de nuca e decúbito lateral obrigatório seguido de morte, foram observados entre o quarto e o sétimo dpi com pico neste último dia. Foi feita a quantificação de animais sintomáticos em cada dia pós-infecção, comparando o número obtido com o total de indivíduos infectados da colônia (n=45).

No segundo e terceiro dpi, os animais apresentavam-se assintomáticos.

No quarto dpi, apenas um animal se encontrava morto na colônia e cerca 15,5% (n= 7/45) estavam sintomáticos. Dentre os cinco que seriam sacrificados, todos apresentavam hipomotilidade, um desses exibia paralisia de um dos membros inferiores, outro estava em estado agônico (moribundo).

No quinto dpi, 45% (n=14/45) dos animais estavam sintomáticos e dois em estado agônico.

No sexto dpi, era notório que além da hipomotilidade, os 26,7% de animais sintomáticos (n=12/45) apresentavam perda de peso, dois deles rigidez de coluna torácica e espasticidade e um deles encontrava-se em decúbito lateral obrigatório e agonizante.

No sétimo dpi, todos os animais que eram sintomáticos, 11% (n=5/45), haviam perdido peso visivelmente, um deles exibia apenas hipomotilidade, dois exibiam rigidez de coluna e espasticidade intensas, um deles exibia paresia bilateral de membros inferiores e dois estavam em decúbito lateral obrigatório. Havia um animal morto na colônia.

No oitavo dpi, os animais estavam assintomáticos.

Tabela 4- Resultados de observações diárias dos animais infectados com o vírus Piry, avaliação do número de animais sintomáticos e moribundos em cada tempo de sobrevivência.

RESULTADOS DE OBSERVAÇÕES DIÁRIAS DOS ANIMAIS							
DPI	1	2	3	4	5	6	7
Doentes				6	12	11	1
Moribundos				1	2	1	4
Mortos				1			1
Sintomáticos				7	14	12	5
% Sintomáticos				7/45 15,5%	14/45 31%	12/45 26,7%	5/45 11%
Fração Moribundos/ Colônia				1/45 2,2%	2/45 4,4%	1/45 2,2%	4/45 8,8%
Sacrificados		6	5	5	5	6	5
Restante	45	39	34	28	23	17	11

Onde:

Total de indivíduos infectados com o vírus= 45.

Animais doentes= pêlo eriçado, hipomotilidade, perda de peso, rigidez de coluna, paresia de membros.

Animais moribundos= rigidez de coluna intensa, com ou sem paresia de membros, decúbito lateral obrigatório, estado agônico.

Sintomáticos= somatória do número de animais doentes e moribundos.

% sintomáticos= Sintomáticos/número de indivíduos da colônia (45) x 100

Fração Moribundos/Colônia = Moribundos/número de indivíduos da colônia (45) x 100

Restante= total de indivíduos infectados com o vírus – animais sacrificados e animais mortos a cada dia.

Notar que no quinto dia havia um grande número de animais sintomáticos e no sétimo dia havia uma maior proporção de animais moribundos na colônia.

4.2. ÁREAS, CÉLULAS ALVO E SEQUÊNCIA TEMPORAL DA NEUROINVASÃO

Os camundongos adultos submetidos à infecção por via intranasal apresentam marcação de antígenos do vírus Piry ao longo da via olfatória, sendo a marcação mais intensa no sentido rostral-caudal e ventral-dorsal.

A primeira marcação antigênica foi detectada no segundo dpi, inicialmente restrita a parte mais rostral do bulbo olfatório e meninges, invadindo o córtex frontal no

4dpi. No 5dpi, a marcação antigênica estava disseminada por todo o córtex, comprometendo inclusive o cerebelo. No sexto dpi, a marcação se assemelhava ao que foi observado 24 horas antes, porém já foi possível notar que as mesmas áreas foram marcadas em menor extensão. No sétimo dpi, a marcação se limitou a raras células no córtex, bulbo olfatório e meninges. Finalmente, no oitavo dpi não foi observada marcação antigênica para o vírus Piry.

A **Figura 2** (A-H) a seguir ilustra, de forma esquemática, a distribuição da marcação para antígenos do vírus Piry em cada tempo de sobrevivida analisado. Foi usada como base para a ilustração, a imunomarcação mais intensa de cada grupo experimental.

Para a confecção dos esquemas, utilizamos imagens do atlas cerebral do camundongo da variedade C57Bl6 (Mouse Brain Atlas, C57BL/6J Horizontal), disponível em http://www.mbl.org/atlas232/atlas232_frame.html. As imagens equivalem aos planos de corte 13, 10 e 07 ilustrados na Figura 2 A, localizados respectivamente a -8.04, -6,24, -4.44mm abaixo do bregma.

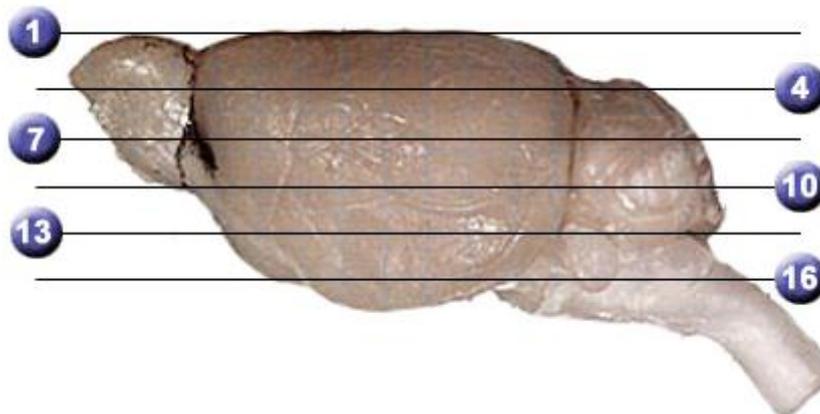


Figura 2A- Ilustração dos planos de cortes eleitos para a representação esquemática da distribuição da marcação antigênica para o vírus Piry. Fonte: Mouse Brain Atlas http://www.mbl.org/atlas232/atlas232_frame.html.

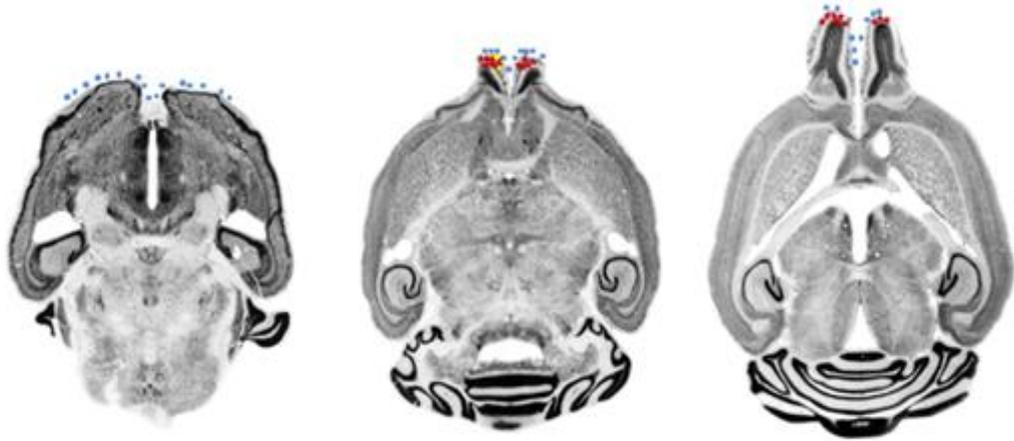


Figura 1B- Distribuição esquemática dos antígenos virais do arbovírus Piry no segundo dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

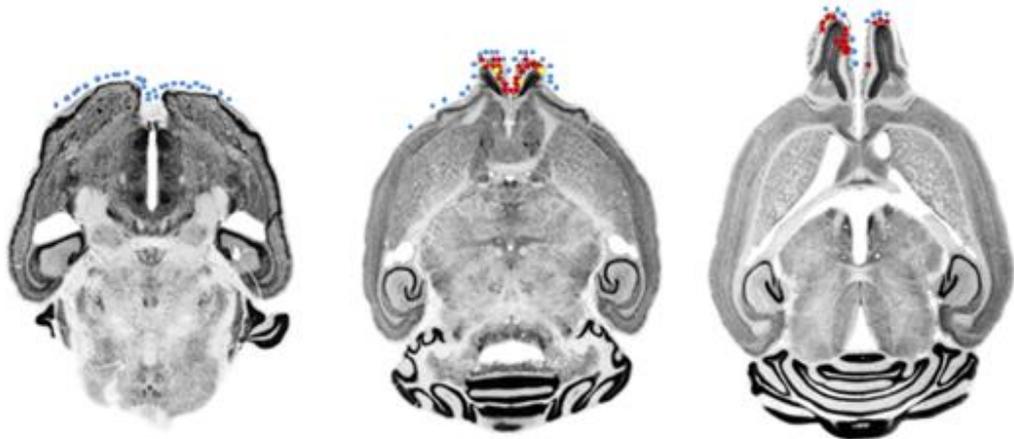


Figura 1C- Distribuição esquemática dos antígenos virais do arbovírus Piry no terceiro dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

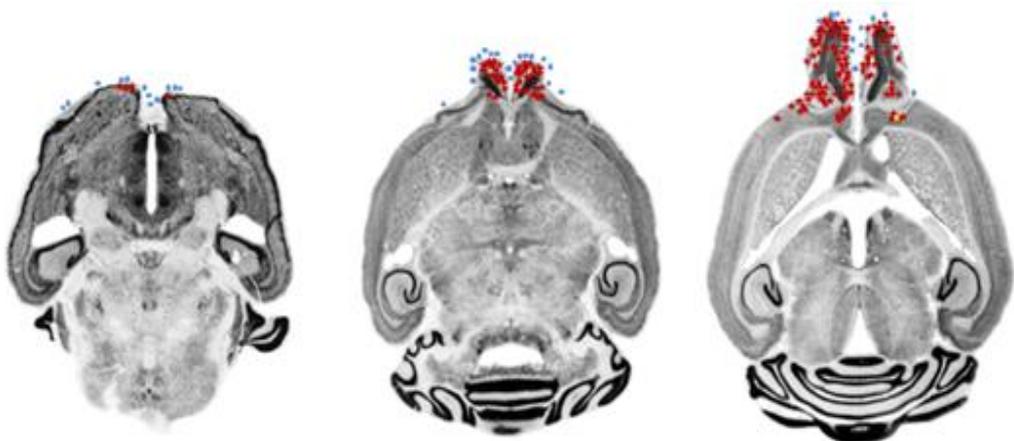


Figura 1D- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no quarto dpi. Círculos azuis (imunomarcção na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

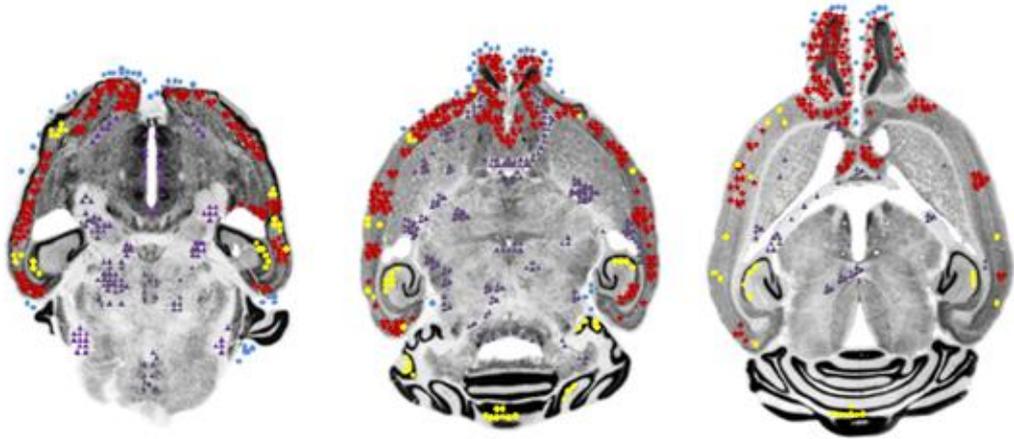


Figura 1E- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no quinto dpi. Círculos azuis (imunomarcagem na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

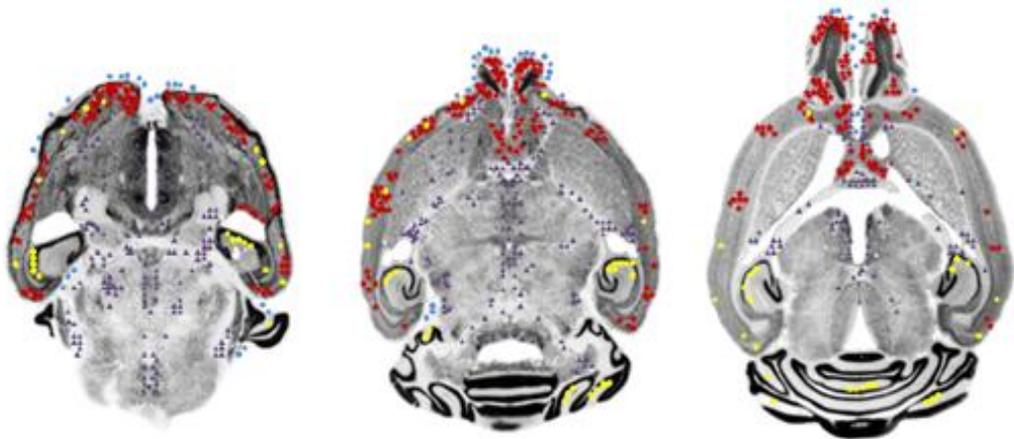


Figura 1F- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no sexto dpi. Círculos azuis (imunomarcagem na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

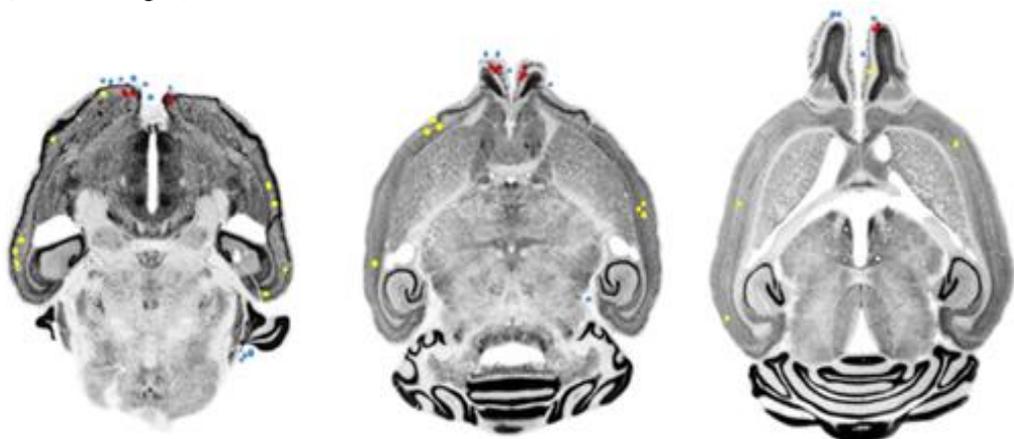


Figura 1G- Distribuição esquemática dos antígenos do arbovírus Piry no sétimo dpi. Círculos azuis (imunomarcagem na meninge), triângulo lilás (substância branca), cruz amarela (neurônios) e estrela vermelha (neurônios e glia).

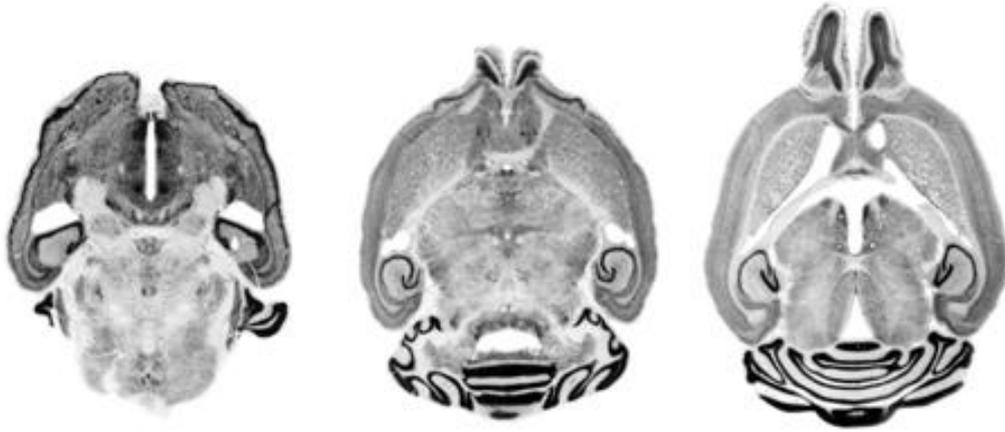


Figura 1H- Ausência de antígenos do arbovírus Piry no oitavo dpi.

A Figura 3 ilustra detalhes dos alvos celulares do arbovírus Piry em áreas selecionadas do encéfalo do camundongo. Pode ser observado que a morfologia das células imunomarcadas para os antígenos virais é compatível com a infecção de neurônios e de células da glia. Estas últimas lembram as morfologias astrocítica e microglial. Também são imunomarcados pela reação para detecção anti-Piry e também através da marcação de anti-IBA-1 células cuja morfologia lembra a dos macrófagos. Note que a disseminação dos antígenos virais ilustrado na Figura 2 parece ser feita a partir do bulbo olfatório pelo trato olfatório (G e H). Em I, representa-se imagem ampliada da região cortical vizinha ao lobo olfatório ilustrada em G, com detalhes das células imunomarcadas. J e K são imagens ampliadas de áreas ilustradas em G para ilustrar a imunomarcação na vizinha dos tratos. Note que há igualmente intensa marcação periventricular com a presença de células cuja morfologia é compatível com macrófagos em (L).

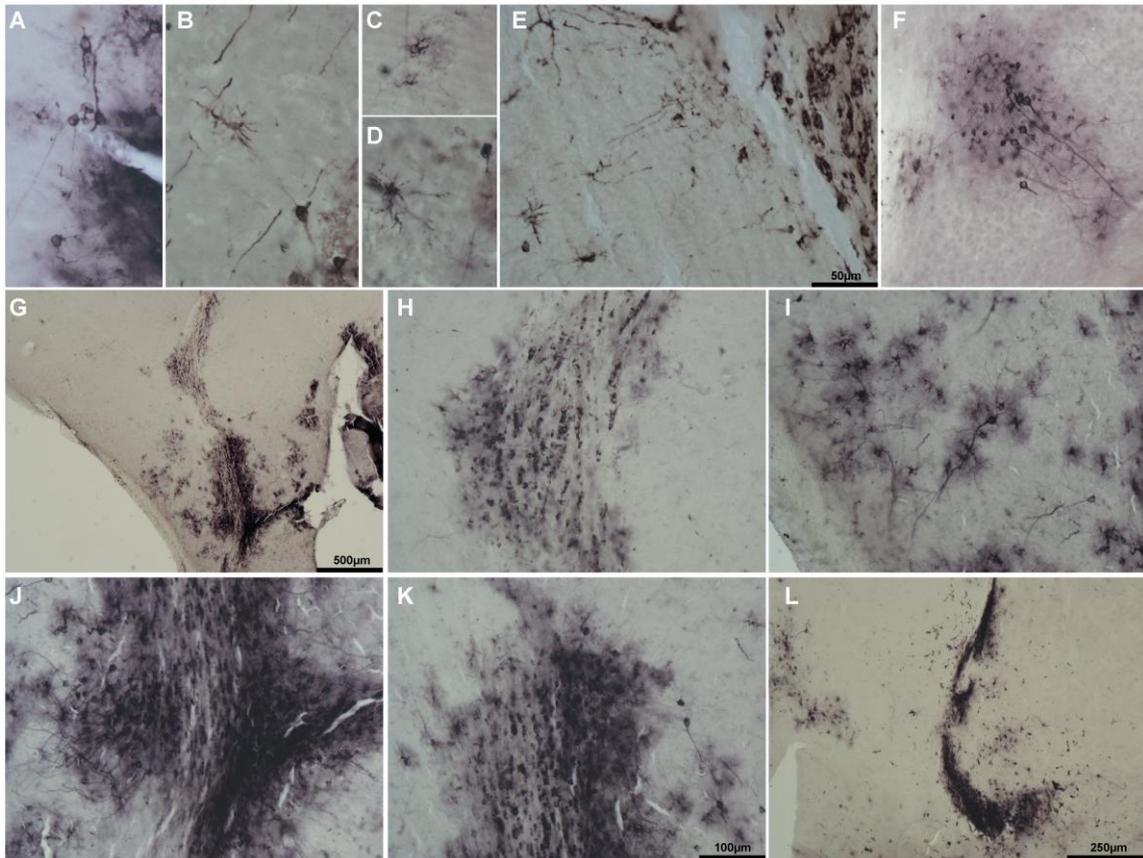


Figura 3- Alvos celulares virais. A-F são fotomicrografias de células cujas morfologias são compatíveis com a de neurônios, astrócitos e microglias. Baixo (G) e médio aumento (H-K) de parte do lobo olfatório e circunjacências ilustrando forte imunomarcção do trato olfatório. Note que a região periventricular também é fortemente imunomarcada e dentre os componentes celulares nessa região há alguns que lembram os macrófagos (L).

4.3. NEUROINVASÃO E SINAIS CLÍNICOS

Um resumo da distribuição da marcação antigênica para o vírus Piry e os sintomas apresentados pelos animais podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 5- Imunohistoquímica para antígenos virais anti-Piry em diferentes tempos de sobrevida, distribuição e avaliação semiquantitativa da intensidade da marcação antigênica e sinais clínicos:

Tempo de sobrevida (dpi)	Áreas Marcadas	Distribuição da marcação	Sinais Clínicos
2	Meninge, vasos sangüíneos e focos no bulbo olfatório, principalmente na região subpial.	(+)	Nenhum
3	Semelhante a 2dpi	(+)	Nenhum
4	Semelhante a 2dpi porém atingindo até córtex frontal	(+) (+)	15,5% sintomáticos 2,2% moribundos
5	Meninge, vasos sangüíneos e intensa no bulbo olfatório, córtex, corpo caloso, septum, focos nas áreas peri-ventriculares, hipocampo, cerebelo e em torno de vasos.	(+) (+) (+) (+)	31% sintomáticos 4,4% moribundos
6	Semelhante ao 5dpi	(+) (+) (+)	26,7% sintomáticos 2,2% moribundos
7	Focos no bulbo olfatório e meninges	(+)	11% sintomáticos 8,8% moribundos
8	Nenhuma	(-)	Nenhum

Onde:

Levando em consideração que a intensidade de marcação das células contendo antígenos de Piry é sempre intensa e homogênea em um experimento, mantendo-se igual em todos os tempos de sobrevida, a avaliação em cruzes representada nesta tabela utilizou como base a distribuição da marcação antigênica anti-Piry nos cortes mais representativos.

(+) = marcação em até 25% da área da secção mais representativa.

(+)(+) = marcação em 25% a 50% da área da secção mais representativa.

(+)(+)(+) = marcação em 50% a 75% da área da secção mais representativa.

(+)(+)(+)(+) = marcação em mais que 75% da área da secção mais representativa.

4.4. RESPOSTA INFLAMATÓRIA INATA

Macrófagos: Observados tanto na marcação para antígenos anti-Piry quanto por anti-IBA-1. A distribuição de sua imunomarcação foi avaliada por anti IBA-1, o mesmo

marcador utilizado para as microglias. No segundo e terceiro dpi, quando os animais estão assintomáticos e há vírus na parte mais rostral do bulbo olfatório, observam-se células compatíveis em sua morfologia com macrófagos e imunomarcadas para IBA-1 na meninge que recobre essa região. No quarto dpi, quando já houve morte na colônia e todos os animais sacrificados estavam doentes, os mais doentes dentre esses (n= 3/5) apresentavam macrófagos no parênquima do bulbo olfatório até sua base e em toda extensão da meninge chegando até o cerebelo e também nos ventrículos laterais. Neste tempo de sobrevivência, dois animais (n=2/5) com poucos sinais clínicos não apresentaram macrófagos no parênquima bulbar, apenas nas meninges e ventrículo lateral. No quinto dpi, quando todos os animais a serem sacrificados estavam sintomáticos (doentes 3/5, moribundos n=2/5), a distribuição dos macrófagos imunomarcados em todos os indivíduos foi semelhante ao observado nos animais sintomáticos do quarto dpi, com aumento considerável da quantidade de macrófagos na meninge. Nesse momento os macrófagos parecem invadir o parênquima, os ventrículos e a meninge, estendendo-se desde o bulbo olfatório e incluindo o trato olfatório, comissura anterior, corpo caloso, base da região septal, até o tronco cerebral. No sexto dpi, todos os animais sacrificados estavam sintomáticos (doentes n=4/5, moribundos n=1/5), a distribuição dos macrófagos imunomarcados foi semelhante ao quinto dpi, mas estendeu-se a toda a região septal e parte do cerebelo onde havia muitos agrupamentos de macrófagos distribuídos de forma difusa. No sétimo dpi, todos os animais sacrificados estavam sintomáticos (doentes n=1/5, moribundos n=4/5) e a quantidade de macrófagos acompanhou o observado no sexto dpi, porém havia agrupamentos maiores de macrófagos no cerebelo e núcleo dentado cerebelar, além de múltiplos grupos de macrófagos no hipocampo. No oitavo dpi os animais não apresentavam sinais clínicos e não houve detecção de antígenos virais, apesar disso, todos os animais sacrificados apresentavam quantidade aumentada de macrófagos na meninge e ventrículos quando comparados aos controles. Quatro dos cinco animais apresentaram pequenos grupos de macrófagos no parênquima do bulbo olfatório, córtex frontal e parietal, região septal e alguns focos no tronco e no cerebelo.

Microglias: A Figura 4 ilustra correlação entre a presença ou ausência de antígenos virais e possíveis alterações na morfologia e distribuição de microglias marcadas por IBA-1 na região septal em seções adjacentes de cérebros de indivíduos cujas estimativas eram mais próximas do valor médio do grupo.

4.5. CINÉTICA QUANTITATIVA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A Tabela 6 ilustra os detalhes das estimativas do número de microglias empregando o fracionador óptico no 3º, 5º e 7º dias após a infecção.

Entre os animais infectados notou-se semelhança na quantidade de microglias no terceiro e quinto dpi. Porém houve uma queda significativa da marcação microglial no sétimo dpi quando comparada aos tempos de sobrevivência que o antecederam ($p < 0,05$ ANOVA, Bonferroni a priori). Isso sugere que a resposta inflamatória inata na região septal se dá antes mesmo da chegada dos antígenos virais já no 3º dpi. Essa resposta microglial que parece atingir o seu pico entre o 3º e o 5º dias após a infecção declina em seguida.

Note que, com exceção do grupo controle, a variabilidade amostral indicada pelo coeficiente de variação biológica expresso em percentagem na tabela 3, oscilou entre 77 a 91%. Isso indica que a contribuição para a variação amostral nesses casos ocorre por conta da variabilidade individual nas estimativas e que a contribuição do erro metodológico (CE médio de Scheaffer) é mínima. No caso do grupo controle, onde a variação biológica contribui com apenas 46% da variação, as estimativas são tão homogêneas que ambos, erro metodológico e biológico, são insignificantes e a regra geral $CE^2/CV^2 < 0.5$ não tem significado e não deve ser aplicada (SLOMIANKA e WEST, 2005).

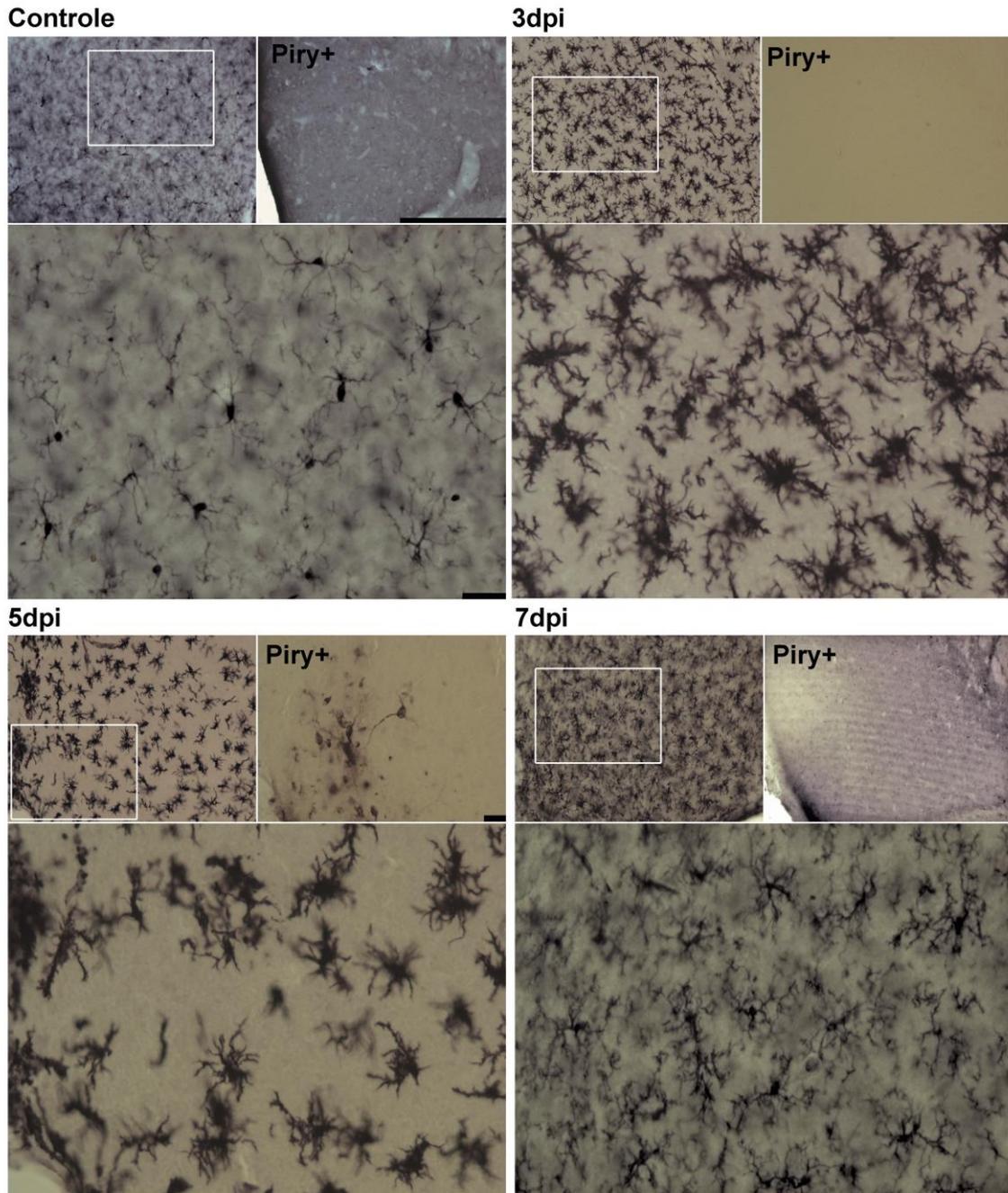


Figura 4- Fotomicrografias em baixo e grande aumento ilustrando a presença ou ausência de antígenos virais e distribuição espacial de microglias na região septal. Note que no 3º dpi ainda que não haja imunomarcção para antígenos virais, a morfologia microglial se distingue claramente da do animal controle em contraste com o 7º dpi onde a morfologia microglial parece quiescente e já parece ter ocorrido o clearance viral. Em situação intermediária, encontra-se a distribuição e a morfologia da microglia no 5º dpi onde ainda se detecta a presença dos antígenos virais.

Tabela 6- Número total de microglias em cada animal (N) e o coeficiente de erro (CE) para estimativas do número de microglias na região septal de fêmeas adultas de camundongos albinos suíços, 3, 5 e 7 dpi.

<i>Microglia</i>							
<i>Animais</i>	<i>Espessura da secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da secção</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
Controle 1	16.97±0.74	12906	0.049	3DPI A2	19.20±1.41	19870	0.050
Controle 2	19.55±0.13	14531	0.051	3DPI A3	21.88±0.10	27211	0.040
Controle 3	20.88±0.61	13357	0.051	3DPI A4	18.17±0.34	24998	0.040
Controle 4	19.26±0.48	12290	0.058	3DPI A5	19.48±0.16	21940	0.040
Média	19.17±0.81	13271	0.052	Média	19.68±0.78	23505	0.043
Desvio Padrão		947		Desvio Padrão		3247	
CV²=(D.P./Média)²		0.005		CV²=(SD/mean)²		0.019	
CE²		0.0027		CE²		0.002	
CE²/CV²		0.54		CE²/CV²		0.095	
CVB²		0.002		CVB²		0.017	
CVB² (% of CV²)		46.00		CVB² (% of CV²)		91	
5DPI A1	20.27±0.28	25228	0.037	7DPI A1	17.31±0.10	21097	0.049
5DPI A2	19.79±0.29	24948	0.04	7DPI A2	19.00±0.09	19973	0.049
5DPI A4	19.70±0.58	21927	0.04	7DPI A3	20.07±0.25	19844	0.046
5DPI A5	18.84±0.27	19775	0.047	7DPI A4	18.96±1.03	16460	0.053
Média	19.65±0.30	22969	0.041	Média	18.83±0.57	19344	0.049
Desvio Padrão		2601		Desvio Padrão		2003	
CV²=(D.P./Média)²		0.013		CV²=(SD/mean)²		0.011	
CE²		0.002		CE²		0.002	
CE²/CV²		0.131		CE²/CV²		0.226	
CVB²		0.011		CVB²		0.008	
CVB² (% of CV²)		87		CVB² (% of CV²)		77	

Os dados são exibidos como números médios de cada membro do grupo (N) e desvio padrão (DP) e coeficiente de erro individual e médio CE. CVB² = CV² - CE² (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

No gráfico 1, ilustra-se uma representação dos valores médios e respectivos erros padrão indicando as diferenças significantes entre os grupos experimentais. Note que o aumento da microglia tal como mencionado ocorre em maior intensidade já no terceiro dpi antes mesmo da presença dos antígenos virais alcançarem o septum, que foi a região de contagem (Figura 1 C). Note que a medida que o vírus se instala na região septal ocorre maior distribuição de macrófagos no parênquima e subsequente redução do número de microglias.

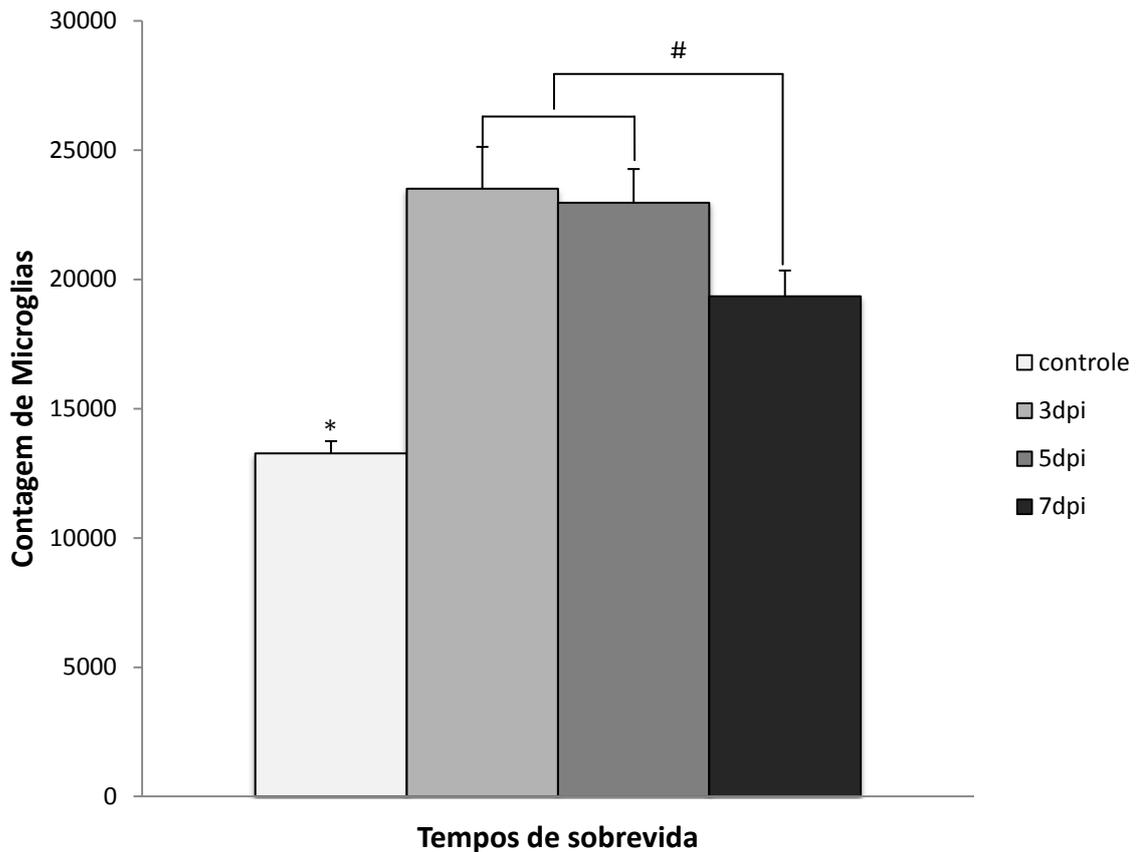


Gráfico 1- Comparação da contagem de microglias totais em animais controle e infectados 3, 5 e 7dpi. Os animais infectados apresentaram elevação na quantidade de microglias em relação ao grupo controle (*= $p < 0,01$). No grupo de 7dpi houve queda na quantidade de microglias quando comparada aos grupos de 3 e 5dpi (# = $p < 0,05$).

A necrose tecidual coincidiu com o aumento do número de macrófagos e isso foi observado em maior proporção no 7º dia após a infecção, quando o número de microglias começa a declinar. Os animais que sobreviveram a esse dia não apresentaram sintomas aparentes no dia subsequente (oitavo dia) sugerindo que a doença pode ter entrado em período de remissão.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, selecionamos o arbovírus Piry como um modelo para induzir encefalite experimental em fêmeas adultas do camundongo albino suíço. O arbovírus Piry foi eleito por produzir doença humana febril (BERGE, 1975, VASCONCELOS et al., 1991), por pertencer ao grupo Sul Americano de RNA-virus, ser encontrado no Brasil (MARRIOTT, 2005, WEAVER, 2006) e produzir encefalite experimental em camundongos neonatos e adultos (DA CRUZ, 1981, WILKS e HOUSE, 1984, GOMES-LEAL et al., 2006, DE SOUSA et al., 2011). Neste estudo, induzimos encefalite viral por inoculação intranasal de homogenado cerebral infectado com o vírus Piry e correlacionamos a resposta inflamatória inata microglial quantificada pelo fracionador óptico com a distribuição dos antígenos virais no parênquima cerebral e com os sinais clínicos de doença em comparação com os animais inoculados com o homogenado cerebral não infectado.

Apesar de que alguns estudos empregaram métodos estereológicos para quantificar aspectos neuropatológicos das encefalites (KETZLER et al., 1990, EVERALL et al., 1999, MARCARIO et al., 2004), nenhum deles se dedicou a estudar a cinética da resposta inflamatória do hospedeiro utilizando estereologia. Como resultado, associações quantitativas entre a resposta inata inflamatória, os sintomas clínicos e a imunomarcacão para antígenos virais não foi firmemente estabelecida. Para quantificar a resposta inflamatória inata, aplicamos o fracionador óptico, um método de alta confiabilidade e precisão que tem sido usado em uma variedade de estudos para determinar o número de células em múltiplas regiões do sistema nervoso central (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991, BONTHIUS et al., 2004). O fracionador óptico não é afetado pelas mudanças histológicas, retração, ou expansão induzida por dano tecidual, uma particularidade importante quando o alvo do estudo são as doenças cerebrais (GUNDERSEN e JENSEN, 1987, WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991, WEST, 2002). Com essa ferramenta, demonstramos no presente trabalho que as alterações no número de microglias e a imunomarcacão para antígenos virais não guardam relação direta podendo haver aumento do número de microglias e alteração em sua morfologia em regiões distantes do sítio de entrada antes mesmo dos antígenos virais invadirem a área de interesse da contagem.

5.1. *NEUROINVASÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA INATA*

Víroses neurotrópicas podem usar o sistema olfatório como uma rota para a invasão do sistema nervoso central de mamíferos sendo essa a via utilizada pelo vírus herpes simplex 1 (ESIRI e TOMLINSON, 1984), vírus da hepatite do camundongo (BARNETT e PERLMAN, 1993), pseudorabdovírus (BABIC et al., 1994), vírus da encefalite eqüina venezuelana (CHARLES et al., 1995) e a variedade CVS do vírus da raiva (LAFAY et al., 1991). No presente trabalho a sequência de neuroinvasão do vírus Piry lembra de perto a do VSV (LUNDH, KRISTENSSON e NORRBY, 1987, HUNEYCUTT et al., 1994) e a de duas Brachorabdoviruses: vírus Itacaiunas e Curionópolis (DINIZ et al., 2006).

No modelo de encefalite viral em camundongos albinos suíços, a ativação da microglia ocorreu relativamente cedo durante a evolução da doença (3 dpi) sem sintomas aparentes. Nesse tempo de sobrevida, estas células não neuronais aumentaram sua proliferação intensamente em relação aos animais controle, imediatamente após esse fato surgiram os sintomas clínicos (4dpi). Nesse sentido parece haver relação temporal entre o número aumentado de microglias e o aparecimento dos primeiros sinais clínicos.

As células microgliais consideradas os macrófagos residentes do sistema nervoso central, são abundantes em todas as regiões e caracterizadas no estado quiescente por padrão de ramificações delicadas e alongadas no tecido normal (PERRY, 2004). Esse fenótipo de microglias residentes pode ser alterado em circunstâncias anormais quando tais ramificações encurtam e se espessam passando a ser consideradas em estado ativado. É possível, entretanto, haver ativação microglial sem necessariamente haver alterações morfológicas (RANSOHOFF e PERRY, 2009). No estado de ativação, as microglias podem migrar para sítios de lesão, proliferar intensamente, e secretar varias citocinas e moléculas citotóxicas. Finalmente, sob condições inflamatórias ou degenerativas elas se ativam plenamente e adquirem o fenótipo fagocítico de aspecto amebóide (ACARIN et al., 1994). A ativação microglial no parênquima cerebral, seguida da neuroinvasão pelo vírus Piry, incluiu principalmente a via olfatória, atingindo a região septal pelo trato olfatório, comprometendo o hipocampo limitando-se a parte ventral de CA3 e da camada polimórfica do giro dentado. Os vírus podem utilizar diferentes rotas para alcançar o SNC, dentre elas o transporte axoplasmático e a via hematogênica durante a viremia. O segundo tipo envolve a infecção de células

mononucleares, especialmente macrófagos perivasculares, podendo resultar de quebra na barreira hematoencefálica, sendo esta via o tipo mais comum de disseminação viral (LANE et al., 1996, CARD et al., 1997, CARD, LEVITT e ENQUIST, 1998, WHITLEY e GNANN, 2002).

Em sujeitos com tempo de sobrevida prolongado, observa-se que a via olfatória é uma porta de entrada bastante freqüente de vírus. No caso do VSV, após a infecção do epitélio nasal, o vírus se propaga 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). A infecção por via olfatória é seguida por neuroinvasão das áreas temporal, parietal, frontal e outras áreas límbicas (LUNDH, KRISTENSSON e NORRBY, 1987, FORGER et al., 1991, HUNEYCUTT et al., 1994). Nos estágios iniciais da infecção induzida por via intranasal (via IN), o vírus VSV utiliza preferencialmente a via olfatória para atingir o SNC, sendo detectado no bulbo olfatório por volta de 4dpi (REISS, PLAKHOV e KOMATSU, 1998), provocando quebra inicial da barreira hematoencefálica no 6dpi, com auge no 8dpi quando os animais são mais sintomáticos e ocorre intensa resposta inflamatória inata (BI et al., 1995). Em tempos mais tardios (15 dpi) a marcação antigênica pode ser detectada no SNC apenas no bulbo olfatório.

O vírus Piry em camundongos neonatos atinge preferencialmente o sistema nervoso central, induzindo necrose e apoptose, sendo a primeira mais evidente no córtex cerebral e a segunda, no hipocampo, levando a morte cerca de 18h após a inoculação por via IN (GOMES-LEAL et al., 2006), o que pode ser uma consequência da resposta inflamatória inata, das células residentes, microglias e astrócitos, e de macrófagos atraídos para a região, induzida pela da infecção e replicação viral nas células alvo (REMPEL et al., 2004). Condizente com este fato, recentemente foi demonstrado que o VSV uma vez no meio intracelular de astrócitos e microglias sofre replicação e esta replicação parece induzir uma robusta secreção de citocinas pró-inflamatórias em níveis até 10 vezes mais altos (CHAUHAN et al., 2010). No caso vírus Piry, não foram feitas medidas da concentração de citocinas no plasma ou nos tecidos para investigar se fenômeno equivalente pode estar ocorrendo nos animais sintomáticos. Entretanto, como o vírus Piry pertence ao gênero Vesiculovirus, tal como o VSV, espera-se comportamento semelhante nos padrões de marcação antigênica, resposta inflamatória na infecção aguda e liberação citocinas de camundongos adultos por via intranasal (BI et al., 1995, DE SOUSA et al., 2011).

Finalmente, detectou-se grande variabilidade na suscetibilidade à infecção dentro da mesma colônia com índice de animais sintomáticos e mortalidade variáveis.

Assim é que, por exemplo, no quinto dpi 50% (14 em 28) dos animais estavam sintomáticos e dois em estado agônico. No sexto dpi além da hipomotilidade, os 21,7% de animais sintomáticos (5 em 23) apresentavam perda de peso, dois deles rigidez de coluna torácica e espasticidade e um deles encontrava-se em decúbito lateral obrigatório e agonizante. Desta forma, parte dos animais evolui a óbito mais cedo do que outros, mas muitos não desenvolvem a forma letal da encefalite. Essa resposta heterogênea à infecção viral pode ser atribuída ao background não isogênico da colônia, e em coerência com essa suposição encontrou-se diferentes intensidades de ativação microglial nas mesmas regiões afetadas dos vários sujeitos. Os estágios iniciais da progressão da encefalite pelo vírus Piry em fêmeas adultas do camundongo albino suíço, vistos nos resultados do presente trabalho, parecem indicar que os tempos de sobrevivência pós-injeção se parecem com aqueles do camundongo da variedade C57Bl6, exceto pelo fato de que a resposta imune parece ser mais homogênea nesta última variedade. Apesar de que o tempo de sobrevivência parece mais heterogêneo na variedade albina suíça, o tempo de início da doença em ambas as variedades é similar (REISS, PLAKHOV e KOMATSU, 1998) abrindo a possibilidade de investigarmos os substratos anatômicos dos diferentes efeitos observados e a ação do vírus Piry nos diferentes elementos que contribuem para a integridade neural. Nesse sentido, o estudo da neuropatologia, associada aos sintomas clínicos no camundongo albino suíço pode levar a novas abordagens na fisiopatologia das encefalites.

5.2. LIMITAÇÕES TÉCNICAS NÃO ESTEREOLÓGICAS

Na análise comparativa entre os diferentes grupos experimentais, é importante considerar estudos quantitativos que eventualmente introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos que podem afetar os resultados, incluindo ambiguidades na definição dos objetos e das áreas de interesse, além das diferenças no processamento de tecidos.

É comum optar por secções obtidas com auxílio de vibrátomo para estudos imunohistoquímicos e isso parece estar relacionado ao fato de que os anticorpos

parecem penetrar mais facilmente e.g. (DORPH-PETERSEN, NYENGAARD e GUNDERSEN, 2001). No presente trabalho, elegemos esse procedimento adotando zona de guarda para evitar o problema do dano tecidual na superfície de corte com perda provável de objetos de interesse se a contagem fosse realizada sem o estabelecimento da zona de guarda (ANDERSEN e GUNDERSEN, 1999). Estudos recentes, entretanto, não encontram perda de objetos de interesse nas superfícies das secções sugerindo o contrário, um acréscimo do número de objetos nessas regiões possivelmente decorrentes da compressão maior nas faces expostas à navalha durante o corte (ver figura 4) (GARDELLA et al., 2003). Assim é possível que esse efeito se traduza em estimativas diferentes quando as caixas de contagens estão dispostas na superfície ou no centro das secções: enquanto a primeira abordagem tenderia a superestimar, a última tenderia a subestimar os valores.

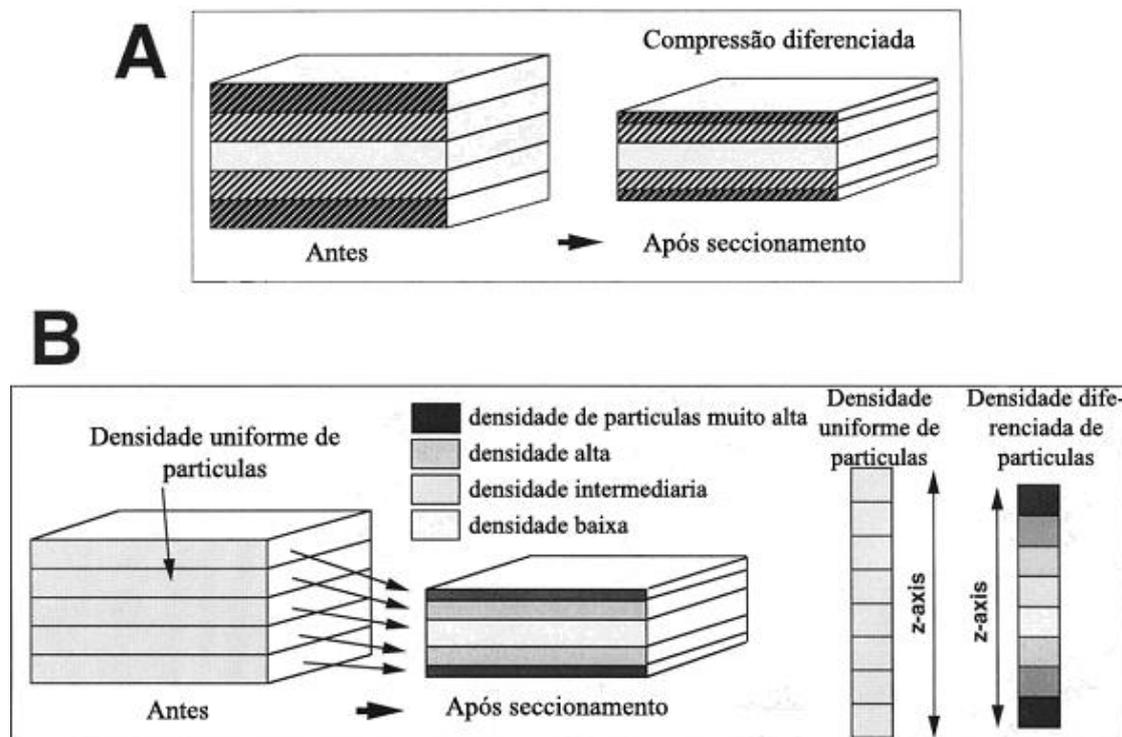


Figura 5- Deformação de seções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferencial não homogênea. Fonte: (GARDELLA et al., 2003)

Este tipo de problema afeta todas as estimativas que empregam o disseccador óptico dado que a densidade de objetos de interesse e o volume de referência são diretamente atingidos pelo efeito de compressão. No presente trabalho, entretanto empregou-se o fracionador óptico, metodologia que não utiliza nem a densidade nem o volume de referência como parâmetros para estimativa do número de neurônios o que a torna imune aos efeitos da retração diferencial e compressão não lineares induzidas pelo processo de fixação, corte e desidratação.

Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total ($CE^2/CV^2 < 0.5$, onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e $CV = (\text{Desvio Padrão}/\text{Média})$). No presente trabalho a relação CE^2/CV^2 esteve sempre abaixo de 0.5 exceto para o grupo dos animais controles, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens. Tal como mencionado antes o erro metodológico individual e médio estimado para esse grupo não ultrapassou 6% (Coeficiente de Scheaffer Médio, $CE = 0.052$) contribuindo muito pouco para a variação amostral. Da mesma forma o coeficiente de variação da amostra representado pela razão DP/Mean não ultrapassou 7% indicando que a variação biológica e o coeficiente de erro são muito pequenos perdendo o sentido aplicar a regra geral (SLOMIANKA e WEST, 2005).

A outra maneira que se empregou para se avaliar os erros relacionados à escolha da matriz amostral foi o cálculo da variação biológica definida como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (onde CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica) expresso em valor percentual do coeficiente de variação. Considera-se que o coeficiente de erro é adequado sempre que ele contribui menos do que a variação biológica para o coeficiente global de variação. Em todos os casos (a exceção do grupo controle pelas razões já mencionadas) encontrou-se que a variação biológica situou-se na faixa de 77 a 91%.

Para reduzir essas possíveis fontes de erro, todos os dados foram obtidos levando em conta um mesmo protocolo de processamento (perfusão, reações imuno-histoquímica, desidratação, etc.) sendo coletados e analisados utilizando o mesmo método estereológico, software e hardware. Para evitar possíveis variações nos critérios para identificar a área de interesse definiu-se a região septal como situada entre dois planos definidos pela secção mais ventral que a continha limitada lateral e posteriormente pelo ventrículo lateral e pelo 3º ventrículos, e a secção mais dorsal

escolhida como a primeira de uma série onde o septum ainda pode ser reconhecido entre o corpo caloso e a fímbria hipocampal (Ver Figura 5).

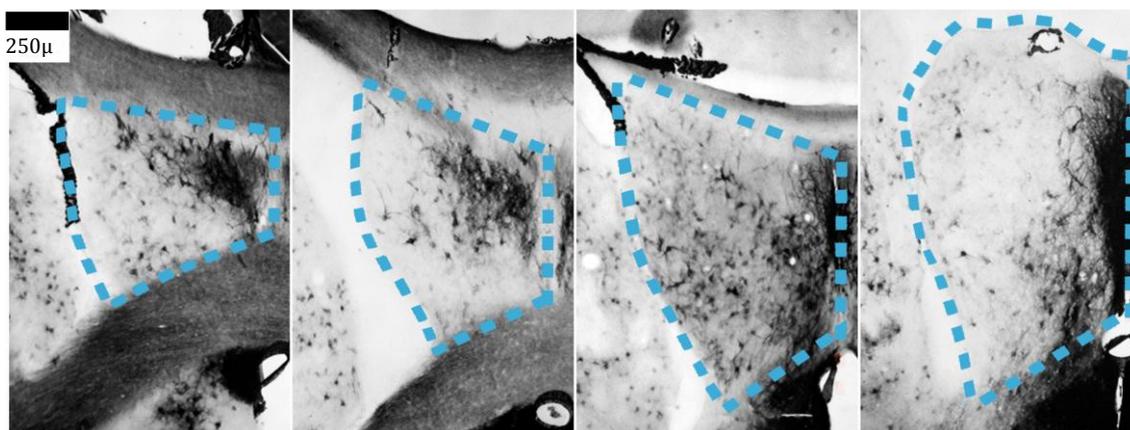


Figura 5- Fotomicrografia de secções anatômicas seriais para definição da área de interesse. Adaptado de Borner et al., 2011.

Além disso, utilizou-se o mesmo anticorpo, anti IBA-1, como imunomarcador seletivo para microglia e macrófago evitando ambigüidades em sua identificação e como resultado, as possíveis variações associadas às fontes não-biológicas foram reduzidas para níveis aceitáveis no presente trabalho (MOUTON et al., 2002, SLOMIANKA e WEST, 2005).

6. CONCLUSÕES

Em estudos prévios, demonstramos pela primeira vez que a instilação nasal de homogenado de cérebro infectado pelo arbovírus Piry em camundongos adultos albinos suíços induz (i) encefalite com neuroinvasão, principalmente das vias olfatórias, septo e hipocampo ventral, (ii) a infecção leva a um aumento do número de microglias e a lesão da matriz extracelular mas nenhuma mudança no número de neurônios e que comparado ao 20 e ao 40 dpi (iii) a infecção pelo vírus Piry ativa a microglia e reduz o número de redes perineuronais em grau mais elevado em 8 dpi, com sinais clínicos presentes.

No presente trabalho, investigamos os eventos precoces da encefalite demonstrando que há (iv) neuroinvasão do bulbo olfatório aos 2 dpi e que já sem encontram (v) alterações significantes da morfologia e do número de microglias na região septal 3dpi, antes mesmo dos antígenos virais alcançarem esta região e antes dos sintomas clínicos de meningoencefalite se tornarem aparentes; (vi) que os sintomas clínicos se tornam aparentes somente no 4 dpi, após as alterações microgliais terem atingido seu valor de pico e que (vii) a necrose tecidual coincidiu com a infiltração macrofágica com pico de ocorrência 7dpi.

Tomados em conjunto, o estudo da neuropatologia quantitativa associada aos sintomas clínicos no camundongo albino suíço podem levar a novos insights na fisiopatologia das encefalites virais.

7. BIBLIOGRAFIA

ACARIN, L., et al. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem*, v.42, p.1033-1041, Aug.1994.

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

BABIC, N., et al. Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation. *Virology*, v.204, p.616-625, 1994.

BARNETT, E.M., PERLMAN, S. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology*, v.194, p.185-191, May.1993.

BECHMANN, I. AND R. NITSCH. "Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electronmicroscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique." *Glia* 20: 145-154. 1997
BERGE, T. International catalogue of arboviruses, 1975.

BI, Z., et al. Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. *J Virol*, v.69, p.6466-6472, Oct.1995.

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

BERGE, T. International catalogue of arboviruses. Atlanta, Georgia, Dept of Health, Education and Welfare, Centers for Disease Control. 1975.

BERGOLD, G. H. AND K. MUNZ. "Characterization of Piry virus." *Arch Gesamte Virusforsch* 31(1): 152-167. 1970.

BEZIRTOGLOU, C., K. DEKAS, et al. "Climate changes, environment and infection: Facts, scenarios and growing awareness from the public health community within Europe." *Anaerobe*. 2011.

BONTHIUS, D.J., et al. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. *Brain Res Brain Res Protoc*, v.14, p.45-57, Nov.2004.

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*, v.3, p.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*, v.72, p.4434-4441, 1998.

CHARLES, P.C., et al. Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. *Virology*, v.208, p.662-671, Apr 20.1995.

CHAUHAN, V.S., et al. Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses. *Virology*, v.400, p.187-196, May 10.2010.

CHRISTIAN, A. Y., M. BARNA, et al. "Host immune response to vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system in C57BL/6 mice." *Viral Immunol* 9(3): 195-205. 1996.

CROTTY, S., L. HIX, 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(Pt 7): 1707-1720. 2002.

DA CRUZ, E.R. Ultrastructural lesions of the brain in albino mice experimentally inoculated with Piry virus (BeAn 24232)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.23, p.194-203, Sep-Oct, 1981.

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

DINIZ, J.A., et al. Characterization of two new rhabdoviruses isolated from midges (*Culicoides* SPP) in the Brazilian Amazon: proposed members of a new genus, *Bracorhabdovirus*. *Arch. Virol.*, v.151, p.2519-2527, 2006.

DORPH-PETERSEN, K.A., NYENGAARD, J.R., GUNDERSEN, H.J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc*, v.204, p.232-246, Dec. 2001.

ESIRI, M.M., TOMLINSON, A.H. Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory and trigeminal pathways after infection of facial skin in mice. *J Neurol Sci*, v.64, p.213-217, May. 1984.

EVERALL, I.P., et al. Cortical synaptic density is reduced in mild to moderate human immunodeficiency virus neurocognitive disorder. HNRC Group. HIV Neurobehavioral Research Center. *Brain Pathol*, v.9, p.209-217, Apr.1999.

FAUCI, A. S. " Infectious diseases: considerations for the 21st century." *Clin. Infect. Dis.* 32: 675-685, 2001.

FAZAKERLEY, J. K. "Semliki forest virus infection of laboratory mice: a model to study the pathogenesis of viral encephalitis." *Arch Virol Suppl*(18): 179-190. 2004.

FIALA, J. C., HARRIS, K. M. "Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes." *J Am Med Inform Assoc* 8(1): 1-16. 2001.

FIGUEIREDO, L. T., et al. "[Prevalence of neutralizing antibodies to Pirý arbovirus in subjects of the region of Ribeirao Preto, State of Sao Paulo]." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 27(3): 157-161, 1985.

FORGER, J.M., et al. Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2d system. *J Virol*, v.65, p.4950-4958, Sep.1991.

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

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

GLASER, J. R., GLASER, E. M.. "Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts." *J Chem Neuroanat* 20(1): 115-126. 2000.

GARDELLA, D., et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J Neurosci Methods*, v.124, p.45-59, Mar 30. 2003.

GEINISMAN, Y., L., et al. "Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives." *Prog Neurobiol* 45(3): 223-252. 1995.

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

GUNDERSEN, H., JENSEN, E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, v.147, p.229-263, 1987.

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*, v.635, p.81-95, 1994.

HOWARD, C. A. M. R. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 2005.

IWASAKI, T., et al. "Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation." *Acta Neuropathol* 108(6): 485-492. 2004.

JOHNSTON, S. C. AND S. L. HAUSER . "Neurological disease on the global agenda." *Ann Neurol* 64(1): A11-12, 2008.

KETZLER, S., et al. Loss of neurons in the frontal cortex in AIDS brains. *Acta Neuropathol*, v.80, p.92-94, 1990.

KUBINOVA, L., JANACEK, J. "Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images." *Microsc Res Tech* 53(6): 425-435.2001.

KUZMIN, I. V., et al. (2009). "The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution." *Infect Genet Evol* 9(4): 541-553, 2001

LAFAY, F., et al. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology*, v.183, p.320-330, Jul, 1991.

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

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

LUNDH, B., KRISTENSSON, K., NORRBY, E. Selective infections of olfactory and respiratory epithelium by vesicular stomatitis and Sendai viruses. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v.13, p.111-122, Mar-Apr, 1987.

MARCARIO, J.K., et al. Severe subcortical degeneration in macaques infected with neurovirulent simian immunodeficiency virus. *J Neurovirol*, v.10, p.387-399, Dec.2004.

MARRIOTT, A.C. Complete genome sequences of Chandipura and Isfahan vesiculoviruses. *Arch Virol*, v.150, p.671-680, Apr.2005.

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

MELLOR, P. S., et al. "Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors." *Annu Rev Entomol* 45: 307-340, 2000.

MOUTON, P.R., et al. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*, v.956, p.30-35, Nov 22.2002.

NYENGAARD, J. R., GUNDERSEN, H. J. "Direct and efficient stereological estimation of total cell quantities using electron microscopy." *J Microsc* 222(Pt 3): 182-187, 2006.

OLIVAL, K. J. AND P. DASZAK . "The ecology of emerging neurotropic viruses." *J Neurovirol* 11(5): 441-446, 2005.

PERRY, V.H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*, v.18, p.407-413, Sep, 2004.

PERRY, V. H., et al. "Microglia in neurodegenerative disease." *Nat Rev Neurol* 6(4): 193-201, 2010.

PETERSON, D. A. "Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures." *Methods* 18(4): 493-507, 1999.

PINHEIRO, F. P. " Piry fever." *Viral zoonosis*. Boca Raton, CRC Press: 187-190. 1981.

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.

POWER, C. A., PROUDFOOT, A. E. "The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets." *Curr Opin Pharmacol* 1: 417- 424, 2001.

RAIVICH, G., et al. "Neuroglial activation repertoire in the injured brain:graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function." *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30: 77- 105, 1999.

RANSOHOFF, R.M., PERRY, V.H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, v.27, p.119-145, 2009.

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, Nov 30, 1998.

REMPEL, J.D., ET AL. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. *Virology*, v.318, p.381-392, 2004.

SCHMITZ, C. AND P. R. HOF (). "Design-based stereology in neuroscience." *Neuroscience* 130(4): 813-831, 2005.

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

STREIT, W. J. AND G. W. KREUTZBERG . "Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin." *J. Comp. Neurol* 268: 248- 263, 1988.

STREIT, W. J., S. A. WALTER, ET AL. "Reactive microgliosis." *Prog. Neurobiol. Aging* 57: 563-581, 1999.

TAO, Y.J., YE, Q. RNA Virus Replication Complexes. *PLoS Pathog* 6(7): E1000943, 2010.

TEELING, J. L., et al. "Sub-pyrogeic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines." *Brain Behavior and Immunity* 21(6): 836-850, 2007.

TRAVASSOS DA ROSA, et al. *An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries* Belém, IEC, 1998.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P., et al. "Two new rhabdoviruses (Rhabdoviridae) isolated from birds during surveillance for arboviral encephalitis, northeastern United States." *Emerg Infect Dis* 8(6): 614-618, 2002.

VAN DER POEL, W. H., et al. "Characterisation of a recently isolated lyssavirus in frugivorous zoo bats." *Arch Virol* 145(9): 1919-1931, 2000.

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* 516(6): 456-481, 2009.

VASCONCELOS, P.F., et al. Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia. *Rev. Inst. Med.Trop. Sao Paulo*, v.33, p.465-476, 1991.

VASCONCELOS, P. F., et al. "Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses." *Cad Saude Publica* 17: 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C., et al. "An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhao State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomologic findings." *Am. J. Trop.Med. Hyg.* 57: 132-137,1997.

VASCONCELOS, P. F. C., et al. "Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses." *Cad. Saúde Pública* 17: 155-164, 2001.

WEAVER, S.C. Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, v.299, p.285-314, 2006.

WEAVER, S. C., REISEN, W. K.. "Present and future arboviral threats." *Antiviral Res* 85(2): 328-345, 2010.

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

WEST, M.J., SLOMIANKA, L., GUNDERSEN, H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*, v.231, p.482-497, Dec.1991.

WHITLEY, R.J., GNANN, J.W. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet*, v.359, p.507-513, Feb 9.2002.

WILKS, C.R., HOUSE, J.A. Susceptibility of various animals to the vesiculovirus Piry. *J Hyg (Lond)*, v.93, p.147-155, Aug.1984.

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

ANEXO A

CARTA DE ACEITE DO COMITE DE ETICA



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



TERMO DE APROVAÇÃO

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

Belém, 12 de setembro de 2005


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFPA