



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

**RENATA RODRIGUES DOS REIS**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NEURPATOLÓGICAS E DO COMPORTAMENTO  
EM TAREFAS HIPOCAMPO-DEPENDENTES INDUZIDAS PELA ENCEFALITE  
EXPERIMENTAL AGUDA ASSOCIADA AO VÍRUS PIRY**

BELÉM – PARÁ  
2012

**RENATA RODRIGUES DOS REIS**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NEURPATOLÓGICAS E DO COMPORTAMENTO  
EM TAREFAS HIPOCAMPO-DEPENDENTES INDUZIDAS PELA ENCEFALITE  
EXPERIMENTAL AGUDA ASSOCIADA AO VÍRUS PIRY**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências.

**Orientador:** Dr. José Antonio Picanço  
Diniz/IEC.

**Co-orientador:** Prof. Dr. Cristovam W. Picanço  
Diniz

RENATA RODRIGUES DOS REIS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NEURPATOLÓGICAS E DO COMPORTAMENTO  
EM TAREFAS HIPOCAMPO-DEPENDENTES INDUZIDAS PELA ENCEFALITE  
EXPERIMENTAL AGUDA ASSOCIADA AO VÍRUS PIRY**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências.

**Banca Examinadora:**

---

Orientador: Dr. José Antonio Picanço Diniz/ IEC.

---

Profa Dra. Roseane Borner/ UFPA.

---

Profa. Dra. Marcia Kronka/ UFPA.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais por acreditarem em mim e permitirem que eu seguisse o caminho da ciência.

Aos meus orientadores Prof. Cristovam, Profa. Marcia e Prof. João meus sinceros agradecimentos, tenho certeza que fui privilegiada por tê-los sempre dispostos a me ajudar, sem o apoio e carinho de vocês eu não teria conseguido.

Ao meu orientador Prof. José Antonio por ter aceitado o desafio de me orientar sendo sempre muito atencioso.

Aos meus amigos do LNI, em especial Camila, que me ajudou muito na fase final do meu trabalho, Rose, César (Ferrugem), Nonata, Nara, Aline Passos, Aline Andrade, Daniel, Carlos Santos, Lane, Thaís e Fernanda, simplesmente por tê-los por perto e por compartilharmos muitos momentos de alegria juntos.

A todos os meus amigos que muitas das vezes entenderam a minha ausência e me ajudaram a seguir em frente.

Ao Instituto Evandro Chagas pela parceria.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro ao projeto.

## RESUMO

Este trabalho investiga as alterações neuropatológicas e do comportamento em tarefas hipocampo-dependentes induzidas pela encefalite experimental aguda associada ao vírus Piry. Três janelas temporais (3, 7 e 10 dias após a inoculação) foram avaliadas e dois ambientes testados de forma a avaliar se o enriquecimento ambiental influencia as alterações associadas à infecção. Camundongos fêmeas de dois meses de idade foram mantidos em ambientes empobrecido (IE) ou enriquecido (EE) durante seis meses e foram testados para as atividades de *burrowing*, de campo aberto e de discriminação olfatória. Após esse período os animais foram inoculados por via intranasal com 5µl de homogenado de cérebro normal (NBH) ou homogenado de cérebro infectado pelo vírus Piry (PY) e então reorganizados nos seguintes grupos: IENBH, IEPY, EENBH e EEPY, com sete animais cada. Três, sete e dez dias após a inoculação (dpi), os animais de cada janela temporal foram perfundidos com fixador aldeídico. Os encéfalos foram removidos, seccionados e as secções foram processadas para imunohistoquímica para anti-Piry e para anti-Iba-1 para marcação dos antígenos virais e de macrófagos/micróglias, respectivamente. Quantificações estereológicas foram feitas em cada camada celular de CA3 usando o método do fracionador óptico. Estimativas do fracionador óptico mostraram que não houve alteração da estimativa do número total de micróglias em CA3 nos grupos analisados, indicando que a infecção não alterou o número de células, mas a morfologia das micróglias, que se mostraram mais ativas no grupo IEPY do que no grupo EEPY. Os resultados revelaram a presença de antígenos virais no bulbo olfatório, córtex piriforme, estriado e fimbria, ao longo da via olfatória. A atividade de *burrowing* no grupo IEPY diminuiu na primeira janela temporal e permaneceu baixa até a última janela, enquanto que no grupo EEPY não houve alteração neste teste. Na atividade de campo aberto, o grupo IEPY aumentou o tempo imóvel já na primeira janela e continuou aumentando até a última; reduziu o número de linhas cruzadas na segunda janela e permaneceu reduzido na última; e diminuiu o tempo na zona central na segunda e última janela. Já o grupo EEPY, aumentou o tempo imóvel e reduziu o número de linhas cruzadas na segunda janela. No teste de discriminação olfatória, o principal grupo afetado foi o grupo IEPY, que não discriminou os dois odores na última janela, enquanto que o grupo EEPY não teve alteração na discriminação.

**Palavras-chave:** encefalite viral, vírus Piry, ambiente enriquecido, neuropatologia, fracionador óptico, camundongo suíço albino.

## ABSTRACT

This study investigated neuropathological changes and behavior in hippocampal-dependent tasks induced by encephalitis caused by Piry arbovirus. Three temporal windows (3, 7 and 10 days post infection) and two environmental conditions were assessed to measure possible effects of the environmental enrichment on infection-induced changes. Two months old female mice, maintained in impoverished (IE) or in enriched environment (EE) by six months were tested in burrowing, open field and olfactory discrimination. After this period, all animals were intranasally inoculated with 5  $\mu$ l of normal (NBH) or infected brain homogenate with Piry arbovirus (PY) and then reorganized into the following groups with seven animals each: IENBH, IEPY, EENBH and EEPY. After three, seven and ten days post instillation (dpi), they were perfused with aldehyde fixative. Their brains were removed, sectioned and the sections were processed either to immunohistochemical with anti-Piry or anti-Iba-1 to marker viral antigens and macrophage/microglial cells, respectively. Stereological quantifications were done in each CA3 layer using the optical fractionator method. Optical fractionator estimations revealed no changes in the number of microglial cells, indicating that this infection was not able to alter the number of cells, but microglia morphology, that revealed a higher number of pro-inflammatory morphological profiles in the IEPY than EEPY. Viral antigens were detected in the olfactory bulb, pyriform cortex, striatum and fimbria, following a sequence that mimics the anatomical olfactory pathway. In IEPY burrowing activity decreased in the first window and remained as such until the last window whereas in EEPY no changes were detected. Immobility increased in IEPY and remained altered until the last window; the number of crossing lines increased in the second and last windows; and the time on the center zone decreased in the second and last windows. In EEPY the immobility increased and correspondently the crossing lines reduced just in the second window. In olfactory discrimination, the main affected group was the IEPY, that didn't distinguish the two odors in the last window; in contrast EEPY group remained unaltered.

**Key Words:** viral encephalitis, PIRY virus, enriched environment, neuropathology, optical fractionator, albino Swiss mice.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Representação esquemática da ativação microglial em processo inflamatório no SNC (VILHARDT, 2005). .....	16
Figura 2-Esquema mostrando a plasticidade funcional da micróglia envolvendo a sua interação com os neurônios durante ativações crônica e aguda (adaptado de GRAEBER e STREIT, 2010). .....	18
Figura 3-Representação esquemática da estimulação visual, motora, cognitiva e somatosensorial proporcionada pelo ambiente enriquecido sobre várias áreas cerebrais (NITHIANANTHARAJA; HANNAN, 2006). .....	19
Figura 4- O circuito hipocampal: o hipocampo forma principalmente um circuito unidirecional, com projeções do córtex entorrinal (EC) para o giro denteado (DG) através da via perfurante (PP) e para CA3; o giro denteado envia projeções através das fibras musgosas (MF) para os neurônios piramidais de CA3, que enviam seus axônios para as células piramidais de CA1 pelos colaterais de Schaffer (SC), assim como as células de CA3 enviam projeções para o hipocampo contralateral pelas fibras comissurais (AC). Os neurônios de CA1 também recebem projeções diretamente da via perfurante e enviam seus axônios para o subículo (Sb). Estes neurônios então enviam a principal saída do hipocampo para o córtex entorrinal, formando uma alça. Fonte: <a href="http://alfin2100.blogspot.com.br/2009/12/clues-on-short-term-memory-in.html">http://alfin2100.blogspot.com.br/2009/12/clues-on-short-term-memory-in.html</a> . .....	22
Figura 5- (a) No camundongo, os neurônios sensoriais olfatórios projetam para um glomérulo específico inervado pelas células mitrais, que projetam para diferentes regiões cerebrais. (b) Esquema mostrando a origem e os alvos das projeções glomerulares. (c) Projeções para a amígdala são organizadas espacialmente, enquanto que as projeções para o córtex piriforme são distribuídas aleatoriamente por toda a região (adaptado de LEINWAND; CHALASANI, 2011). .....	24
Figura 6-Ilustrações do ambiente enriquecido (EE) equipado com rodinhas de correr e objetos de cores e formas diferentes (A), e do ambiente empobrecido (IE) com redução de estímulos multisensoriais (B).....	28
Figura 7-Distribuição dos animais em cada grupo experimental. ....	29
Figura 8-Aparato utilizado para a realização do teste de <i>burrowing</i> .....	30
Figura 9-Esquema mostrando o aparato utilizado para realizar o teste de discriminação olfatória.....	32
Figura 10-Desenho experimental adotado neste trabalho (BU- <i>Burrowing</i> ; DO-Discriminação olfatória; OF- <i>Open field</i> ; dpi-Dias pós-inoculação).....	32
Figura 11-Delimitação das camadas de CA3 através do fracionador óptico (O-Oriens; P-Piramidal; L-Lúcido; R-Radiato; LM-Lacunoso molecular).....	38

Figura 12-Caixas de contagem com as linhas de inclusão (verde) e exclusão (vermelha), nas interseções do grid de contagem. À direita, representação tridimensional da caixa de contagem com a sua altura em relação à espessura do tecido. Adaptado de <a href="http://www.uhnresearch.ca/wcif">www.uhnresearch.ca/wcif</a> . .....	39
Figura 13-Fotomicrografias das células infectadas pelo arbovírus Piry ao longo da via olfatória nos grupos EEPY e IEPY aos 7 dpi PIR: piriforme; VIA OLF: via olfatória; CA3 VT: CA3 ventral; FIMB: fimbria. Escalas: menor aumento (250µm); maior aumento (25µm)	42
Figura 14-Fotomicrografias de secções imunoreagidas para anti-Iba-1 dos grupos controles e dos grupos infectados nas três janelas temporais em CA3. Escalas: 250µm (menor aumento) e 25µm (maior aumento). .....	43
Figura 15-Gráficos mostrando a atividade de <i>Burrowing</i> dos grupos experimentais em relação ao NBH em cada janela temporal. (*) diferença significativa em relação ao baseline; (#) diferença significativa em relação ao NBH ( $p < 0,05$ , ANOVA um critério).....	44
Figura 16-Atividade de campo aberto (número de linhas cruzadas e tempo imóvel) de cada grupo experimental nas janelas temporais testadas. (*) diferença significativa em relação ao baseline; (#) diferença significativa em relação ao NBH ( $p < 0,05$ , ANOVA um critério). .....	45
Figura 17-Atividade de campo aberto (tempo no quadrado central) de cada grupo experimental nas janelas temporais testadas. (*) diferença significativa em relação ao baseline; (#) diferença significativa em relação ao NBH ( $p < 0,05$ , ANOVA um critério). .....	46
Figura 18-Discriminação olfatória dos animais dos grupos IE e EE aos 2,6 e 9 dias após a inoculação viral. (*) $P < 0,05$ (ANOVA um critério).....	47
Figura 19- Primeira escolha do animal ao ser colocado no centro do aparato do teste de discriminação olfatória. Resultados em porcentagem mostrando o comportamento de cada grupo nas janelas estudadas. ....	48
Figura 20- Dados estereológicos da estimativa do número de micróglia totais em CA3 nos grupos controles e infectados nas janelas temporais estudadas.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BU	<i>Burrowing</i>
CA1	Corno de Amon 1
CA2	Corno de Amon 2
CA3	Corno de Amon 3
CA4	Corno de Amon 4
DO	Discriminação olfatória
GABA	Ácido gama amino-butírico
IEC	Instituto Evandro Chagas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
L	<i>Stratum lucidum</i>
LM	<i>Stratum lacunosum moleculare</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito
MHC	Complexo de histocompatibilidade
O	<i>Stratum Oriens</i>
OF	<i>Open field</i>
P	<i>Stratum Pyramidale</i>
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
R	<i>Stratum radiatum</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VSV	Vírus da estomatite vesicular

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 ARBOVIROSES .....	11
1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA MICROGLIAL.....	14
1.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E NEUROPROTEÇÃO .....	19
1.4 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL .....	21
1.5 SISTEMA OLFATÓRIO .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 GERAL.....	26
2.2 ESPECÍFICOS .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS E ALOJAMENTO .....	27
3.2 PROCEDIMENTOS PARA INOCULAÇÃO VIRAL .....	28
3.3 TESTE DE REMOÇÃO E ESTOCAGEM DE COMIDA ( <i>BURROWING</i> ) .....	29
3.4 ATIVIDADE DE CAMPO ABERTO ( <i>OPEN FIELD</i> ) .....	30
3.5 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA .....	31
3.6 PERFUSÃO E PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO .....	32
3.7 FOTOMICROGRAFIAS .....	36
3.8 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA .....	37
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 NEUROPATOLOGIA.....	41
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	424
4.2.1 Atividade de <i>Burrowing</i> .....	44
4.2.2 Atividade de campo aberto ( <i>Open Field</i> ).....	45
4.2.3 Discriminação olfatória.....	46
4.3 RESULTADOS ESTEREOLÓGICOS.....	48
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ARBOVIROSES

As encefalites subletais subseqüentes às infecções virais promovem alterações comportamentais e imunológicas representando proporção importante das sequelas neurológicas permanentes, particularmente em países emergentes (JOHNSTON e HAUSER, 2008). Dentre as doenças virais emergentes que comprometem o SNC gerando encefalites, a maioria delas está associada à doenças produzidas por RNA-vírus (KUZMIN et al., 2009). Essas viroses nos últimos 20 anos têm castigado homens e animais domésticos com impactos sociais e econômicos significativos, com reemergência e expansão daquelas que pareciam sob controle (GUBLER e MELTZER, 1999; GUBLER, 2002). São exemplos bem conhecidos a dengue, a encefalite japonesa, a febre amarela, a encefalite equina venezuelana e a doença produzida pelo vírus do Oeste do Nilo. As razões para esse ressurgimento são complexas e desconhecidas, no entanto, é fato que estão associadas às mudanças demográficas e sociais que vem ocorrendo ao longo dos últimos 50 anos (GUBLER, 2002).

Não é difícil, portanto, antecipar as razões pelas quais as arboviroses emergentes e re-emergentes tornaram-se parte obrigatória das agendas de saúde global ampliando-se os esforços e os recursos destinados a sua investigação.

As arboviroses (viroses transmitidas por artrópodes) são viroses zoonóticas de genoma de RNA que por definição requerem no mínimo dois hospedeiros, um artrópode e um vertebrado. Existem 534 viroses registradas no Catálogo Internacional de Arboviroses, das quais 134 são provocadas em humanos (KARABATSOS, 1985).

Os arbovírus são taxonomicamente diversos abrangendo oito famílias virais e quatorze gêneros (GUBLER, 2002). Na região amazônica, de um total de 190 arbovírus isolados pelo Instituto Evandro Chagas, 32 foram identificados como patógenos humanos causando febre, doença hemorrágica e encefalite, sendo que 15 das espécies isoladas pertencem à família *Rhabdoviridae* (VASCONCELOS et al., 2001). As rabdoviroses são parte de um grupo grande de doenças associadas a RNA-vírus de uma única fita que incluem patógenos de importância médica tais como o da influenza aviária, sarampo, Ebola e estomatite vesicular (KUZMIN et al., 2009).

A família *Rhabdoviridae* possui cinco gêneros amplamente distribuídos na natureza e dois deles são relevantes na região amazônica, o gênero *Vesiculovirus* e o gênero *Lyssavirus*. Como exemplo de vesiculovírus, o vírus da estomatite vesicular (VSV) é caracterizado por causar lesões vesiculares que acometem equinos, bovinos, suínos, mamíferos silvestres e o homem. Esses vírus podem infectar células neuroepiteliais representando um modelo para investigação de infecções virais neurotrópicas agudas (HUNEYCUTT et al., 1993).

Num esforço de contribuir para a investigação das arboviroses estudamos em nosso laboratório em trabalho anterior sete das espécies amazônicas da família *Rhabdoviridae* buscando induzir encefalites experimentais a partir de inoculação viral intranasal (IN) de camundongos neonatos, a saber: Jurunas, 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). Pelo fato de o VSV ter 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 et al., 1998; VAN DEN POEL 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 celular inflamatória 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 se conhecer 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 não tem sido estudada em detalhe. Por essa razão em trabalho subsequente quantificamos a resposta inflamatória do hospedeiro adulto durante o curso temporal da encefalite induzida por um RNA vírus da família *Rhabdoviridae*, o arbovírus Piry (SANTOS e BRAGA, 2008).

O arbovírus amazônico Piry, da família *Rhabdoviridae* e gênero *Vesiculovirus*, foi isolado pela primeira vez em 1960 das vísceras de um marsupial (*Phlanderopossum*) na floresta do Utinga em Belém-PA por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas. Este arbovírus é responsável por induzir no camundongo uma infecção degenerativa e neurotrópica caracterizada por uma encefalite com lesões graves, de células isoladas e/ou regiões específicas (DA CRUZ, 1981), que evoluem para necrose ou apoptose, sendo que a primeira é mais evidente no córtex cerebral e a segunda no hipocampo, podendo ocasionar a morte cerca de 18h após a inoculação em camundongos recém-nascidos (GOMES-LEAL et al., 2006).

Partículas virais em forma de “bala de revólver” medindo 155 x 62nm foram encontradas através da microscopia eletrônica em cisternas endoplasmáticas e membranas citoplasmáticas de secções de cérebros de camundongos neonatos, em culturas de células BHK-21 e em culturas de células de *Aedes albopictus* infectados pelo vírus Piry (PINHEIRO, 1981).

A inoculação intracerebral com o vírus Piry em camundongos neonatos desenvolve uma miocardite serosa capaz de induzir necrose em fibrinocélulas, com modificação mais precoce nas mitocôndrias (tumefação, cristólise intensa e rarefação da matriz) além de provocar uma encefalite com lesões graves no estágio final da doença (ARAÚJO et al., 1978). Dessa forma, o vírus Piry parece induzir uma resposta inflamatória discreta, na fase final da evolução, com diminuição da eletrodensidade e marginalização da cromatina nuclear, além do reagrupamento de organelas citoplasmáticas, principalmente mitocôndrias e complexo de Golgi (DA CRUZ, 1981).

Sabe-se ainda da existência de casos humanos de infecção pelo Piry como resultado de contaminação acidental em laboratório, provavelmente, por meio da inalação de aerossóis, o que aumenta a importância do seu estudo (TAVARES-NETO et al., 1990). Os casos clínicos descritos com o Piry tiveram início súbito, semelhante à influenza, com síndrome febril de curta duração (de dois a quatro dias), cefaleia, mialgia, mal estar, tonturas e fotofobia (TAVARES-NETO et al., 1990, TAVARES-NETO, 1993).

O diagnóstico laboratorial para o Piry é baseado no isolamento viral e em testes sorológicos com presença de anticorpos neutralizantes para esse vírus variando de 4 a 17% nas comunidades residentes ao longo do Baixo Amazonas (PINHEIRO, 1981). Um estudo realizado para se conhecer os níveis de anticorpos de indivíduos da região de Ribeirão Preto-

SP mostrou que 19,9% dos indivíduos apresentaram anticorpos, sugerindo infecções por arbovírus. E para o vesiculovírus Piry foi encontrado o maior número de soros reagentes (12,5%) (FIGUEIREDO; TRAVASSOS DA ROSA; FIORILLO, 1986). Em Uberaba-MG, 8% dos doadores de sangue apresentaram anticorpos neutralizantes para o Piry, com prevalência significativa de indivíduos que relataram residir anteriormente em área rural em relação aos residentes de cidades (TAVARES-NETO et al., 1990).

Esses achados mostram que apesar de existirem poucas informações a respeito das arboviroses em locais com a paisagem modificada, sabe-se que esses vírus poderiam manter-se nesses locais como zoonoses em matas residuais, sendo introduzidos eventualmente nessas áreas e, após encontrar um vetor adequado, infectar animais silvestres domésticos e o homem. Ou ainda, os arbovírus restantes do antigo meio natural, poderiam se manter na natureza sob condições restritas até se adaptarem ao meio artificial (FIGUEIREDO; TRAVASSOS DA ROSA; FIORILLO, 1986).

Associado a isto, sabe-se que as micróglia são capazes de reconhecer uma grande variedade de patógenos que podem afetar o SNC incluindo bactérias, vírus e fungos, estando relacionadas com o início e a perpetuação da inflamação. Um exemplo disso é a ativação microglial observada em camundongos a partir do terceiro dia após a inoculação intranasal com o VSV, causando uma infecção aguda no SNC capaz de ativar a imunidade inata (produzindo óxido nítrico) e a imunidade adquirida (expressando moléculas do complexo de histocompatibilidade) (BI et al., 1995). Por fazerem parte da resposta inflamatória no SNC é relevante rever alguns de seus aspectos.

## 1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA MICROGLIAL

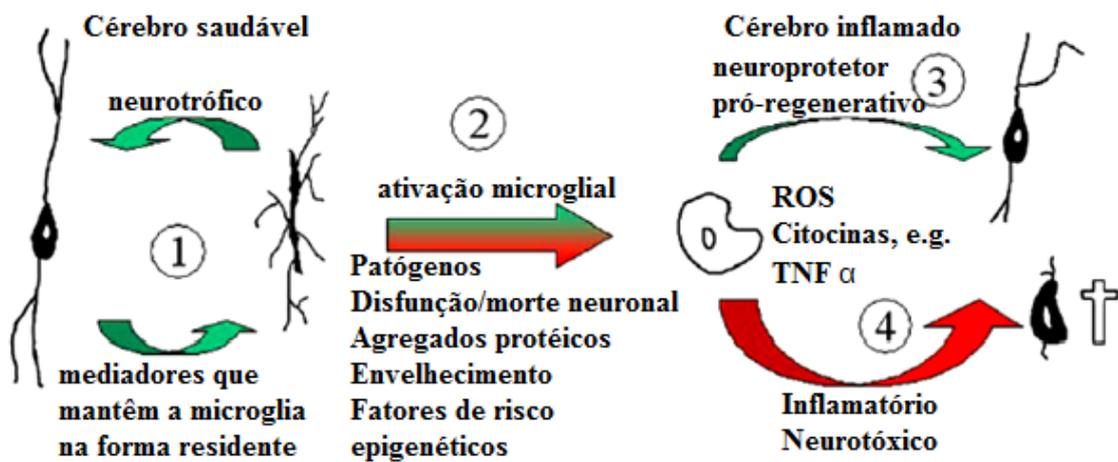
As micróglia são macrófagos cerebrais com funções específicas de defesa do SNC contra microrganismos (incluindo bactérias, vírus e algumas espécies de fungos), remoção de debris celulares em doenças neurodegenerativas ou durante o desenvolvimento normal, e desordens inflamatórias autoimunes do cérebro (ZIELASEK; HARTUNG, 1996, MARIANI; KIELIAN, 2009, ROCK et al., 2004).

No SNC normal, as micróglia residentes, que possuem corpo celular alongado e processos ramificados longos constituem uma população estável de células quiescentes distribuídas ao longo do parênquima cerebral que responde a mudanças mínimas no SNC, reagindo rapidamente aos eventos patológicos. (LADEBY et al., 2005).

Lesões no tecido neuronal e/ou vasos sanguíneos do parênquima desencadeiam respostas morfológicas imediatas de células microgliais próximas às regiões afetadas. Com os vasos sanguíneos lesados, uma série de fatores derivados do sangue penetra no parênquima do SNC atuando como fatores ativadores de micróglia. O reconhecimento desses fatores por essas células ocorre graças à presença de uma grande variedade de receptores de superfície celular e nucleares capazes de iniciar ou modular a resposta imune microglial. Entre os receptores, incluem-se os receptores de componentes do sistema do complemento, esteroides, produtos de bactérias, imunoglobulinas, moléculas de adesão celular, citocinas e quimiocinas (GARDEN; MOLLER, 2006).

Células fagocíticas da imunidade inata reconhecem patógenos através de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), dentre os quais se destacam os receptores Toll-like presentes principalmente em macrófagos e células dendríticas. Assim, ocorre a expressão de moléculas de ativação de superfície celular (por exemplo, as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II, e CD40), a secreção de citocinas inatas como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a secreção de interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-12 e IL-18. Uma vez ativada, o objetivo da resposta inata é ativar células da imunidade adaptativa para ambas promoverem a neutralização e retirada do patógeno invasor (TOWN; NIKOLIC; TAN, 2005)

Em condições fisiológicas normais, a micróglia fornece suporte neuronal e em troca recebe mediadores dos neurônios para se manter na forma latente (figura 1-1). Já em resposta a um estímulo nocivo, a micróglia adquire morfologia ameboide caracterizando o estado de ativação (figura 1-2). Essa ativação microglial induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias como prostaglandinas, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e quimiocinas, além de secretar proteases, gerar espécies de oxigênio reativas (ROS) e intermediários de nitrogênio. Se a concentração desses mediadores é mantida em certos níveis o hospedeiro se torna tolerante e a micróglia exerce papel neuroprotetor (figura 1-3), no entanto, se esses níveis tolerantes são ultrapassados, inicia-se o mecanismo neurotóxico que resulta em disfunção e morte neuronal (figura 1-4) (VILHARDT, 2005).



**Figura 1**-Representação esquemática da ativação microglial em processo inflamatório no SNC (VILHARDT, 2005).

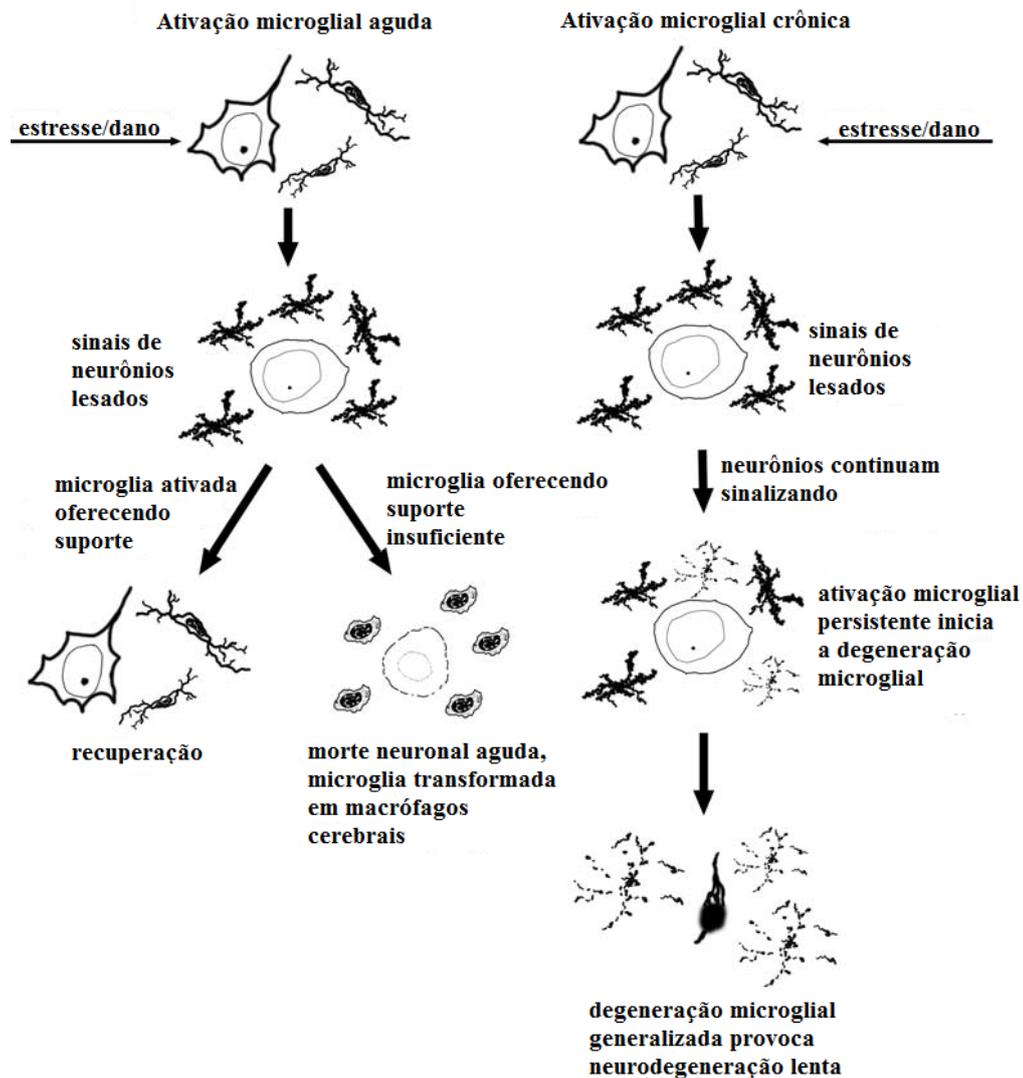
Estudos prévios sobre doenças neurodegenerativas mostraram que a micróglia ativada pode se tornar neurotóxica pela produção de citocinas pró-inflamatórias como  $TNF-\alpha$  e IL-6, mas por outro lado, também pode ser neuroprotetora por produzir componentes neurotróficos como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (SAWADA, M.; SAWADA, H.; NAGATSU, 2008).

Marcadores de superfície celular de importância na regulação imune, como as moléculas MHC II, são constitutivamente expressas na micróglia ramificada do cérebro normal. Além das glicoproteínas do MHC de classe I e II, uma população de micróglia tem propriedades de células dendríticas durante condições infecciosas e inflamatórias capaz de apresentar antígenos aos linfócitos auxiliares Th1 (ROCK et al., 2004).

Apesar dos inúmeros esforços para estudar a ativação microglial, ainda não encontraram um único marcador molecular que permita uma distinção inequívoca entre a micróglia ativada e a residente. Sendo assim, essa distinção é feita com a associação de múltiplos marcadores e características morfológicas. Além disso, nos últimos anos, o conceito de plasticidade funcional microglial tem ganhado enfoque com o reconhecimento de um quarto fenótipo microglial, denominado distrófico. Este fenótipo estaria relacionado ao envelhecimento e às doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento. O processo de degeneração ainda não foi bem elucidado, mas se acredita que a ativação crônica da micróglia durante um longo período pode levar a uma excessiva ativação microglial que, por conseguinte, provocaria uma degeneração da mesma através do desenvolvimento de uma

“memória” funcional capaz de aumentar a suscetibilidade, por exemplo, a doença de Alzheimer (para revisão ver GRAEBER e STREIT, 2010).

A figura 2 representa um esquema de como funcionaria essa plasticidade microglial envolvendo a comunicação entre neurônio e micróglia durante ativações crônica e aguda. Para que ocorra a ativação microglial sinais são emitidos dos neurônios danificados para que as micróglias residentes se dividam, aumentem a produção de citocinas e de fatores de crescimento e mudem a sua expressão antigênica de superfície. O aumento da atividade microglial resulta na hipertrofia celular, representando uma reação neuroinflamatória aguda, capaz de trazer ou não a recuperação neuronal ao estresse. Caso esse processo seja bem sucedido, o excesso de células microgliais será eliminado através do processo de morte celular programada. Caso contrário, a morte neuronal aguda resultará na transformação de micróglias em macrófagos cerebrais derivados do cérebro que eliminarão os debrís celulares. A reação neuroinflamatória crônica ocorre se os neurônios afetados continuam a enviar sinais de ativação que resultam em ativação microglial persistente. Essa ativação prolongada induzirá algumas micróglias a se tornarem senescentes e passarem por alterações neurodegenerativas, capazes de provocar uma degeneração microglial generalizada. Uma vez que um número crítico de micróglias é submetido a esse tipo de morte celular acidental, os neurônios terão perdido o apoio microglial e estarão submetidos a uma neurodegeneração lenta, refletida por inclusões anormais (por exemplo, corpos de Lewy) e/ou neurodegeneração neurofibrilar (GRAEBER e STREIT, 2010).



**Figura 2**-Esquema mostrando a plasticidade funcional da micróglia envolvendo a sua interação com os neurônios durante ativações crônica e aguda (adaptado de GRAEBER e STREIT, 2010).

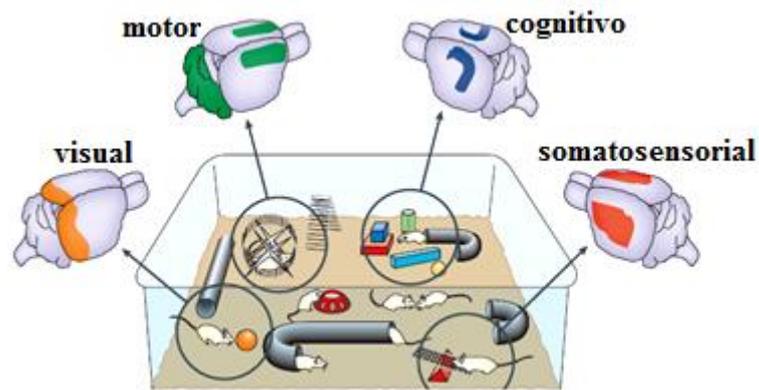
Um estudo recente mostrou um aumento da ativação microglial em camundongos da variedade BALB/c infectados pelo vírus da encefalite japonesa. A expressão de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e da proteína quimioatratante de monócito 1 (MCP-1) foi significativamente maior nos animais infectados em relação aos animais controles. Além disso, esse trabalho avaliou as citocinas pró-inflamatórias em diferentes estruturas cerebrais (tálamo, hipocampo, córtex e estriado) mostrando um aumento relevante no hipocampo em relação às outras estruturas cerebrais (GHOSHAL et al., 2007).

No que diz respeito à resposta inflamatória, vale ressaltar que estudos recentes sugerem uma interação entre micróglia e astrócitos, uma vez que ambos reagem rapidamente ao estímulo adequado mínimo e são produtores de citocinas e quimiocinas. Dessa forma,

acredita-se que essas células podem influenciar fortemente umas às outras de forma a facilitar e amplificar as respostas imunes (LYNCH, 2009).

### 1.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E NEUROPROTEÇÃO

O enriquecimento ambiental é definido como um complexo de estimulação inanimada e estimulação social (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000), no qual os animais são agrupados em compartimentos experimentais contendo túneis, plataformas, brinquedos e rodas de correr, que por si só induzem comportamento ativo e provocam estimulação sensorial, social, motora e cognitiva (ver figura 3). (NITHIANANTHARAJA; HANNAN, 2006).



**Figura 3**-Representação esquemática da estimulação visual, motora, cognitiva e somatosensorial proporcionada pelo ambiente enriquecido sobre várias áreas cerebrais (NITHIANANTHARAJA; HANNAN, 2006).

Muitos estudos têm mostrado mudanças significantes a níveis celular, molecular e comportamental, principalmente no hipocampo, de roedores alojados em ambientes enriquecidos. Essas mudanças provocam melhora do aprendizado e memória, aumento da neurogênese no giro denteado do hipocampo, da gliogênese e da árvore dendrítica, e a formação de novas sinapses em muitas áreas do cérebro como córtex e gânglios da base. Tais condições parecem proteger o organismo contra os déficits cognitivos relacionados a várias doenças neurodegenerativas crônicas e agudas (MORA; SEGOVIA; DEL ARCO, 2007, VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

Camundongos idosos Tg2576, modelo transgênico da Doença de Alzheimer, que foram tratados com exercício voluntário exibiram melhor desempenho no teste do labirinto aquático com braço radial quando comparados com animais transgênicos não tratados. Este estudo sugere que o exercício voluntário provoca mudanças na resposta inflamatória capazes

de melhorar a cognição em camundongo Tg2576 (PARACHIKOVA; NICHOL; COTMAN,2008). Além disso, estudos em humanos sugerem que a atividade física pode produzir efeitos benéficos como melhora das funções cognitivas e executivas, aumento do aporte sanguíneo cerebral e de neurotrofinas séricas ao longo da vida, inclusive em pacientes com doenças neurodegenerativas (HILLMAN; ERICKSON; FRAMER, 2008).

Na infecção crônica induzida pela injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos, o exercício voluntário aumentou o nível de BDNF e do seu receptor TrkB, melhorando a neurogênese e o desempenho cognitivo comprometidos pelo LPS (WU et al., 2007). Sabe-se também que o ambiente enriquecido provoca um aumento no número de micróglia ativas com morfologia ramificada no giro denteado. Essas micróglia liberam o fator de crescimento derivado da insulina (IGF-1), que tem um papel importante na proliferação neuronal na camada subgranular do giro denteado e na neuroproteção (CHOI et al., 2008).

Estudo realizado em camundongos envolvendo o vírus influenza, patógeno respiratório que causa grande morbidade e mortalidade em humanos, mostrou que a taxa de mortalidade foi reduzida em animais que foram exercitados moderadamente quando comparados com animais sedentários (LOWDER; PADGETT; WOODS, 2005). Assim como em animais, estudos epidemiológicos, que analisaram adultos sob diferentes estilos de vida, mostraram que pessoas que praticavam exercícios físicos de grau leve a moderado tiveram redução da taxa de mortalidade durante uma epidemia causada por influenza, enquanto que o exercício exagerado não parece ser benéfico devido à inflamação induzida e à imunidade comprometida (WONG et al, 2008).

O enriquecimento ambiental também atua sobre a perda de rede perineuronal encontrada na área de representação da pata posterior no córtex somatosensorial de ratos idosos, reduzindo ou prevenindo a perda desta matriz em ratos alojados por 3 meses nessas condições (HILBIG et al., 2002). Sabendo que a formação hipocampal é uma estrutura chave nos processos de consolidação da memória e que esta é particularmente vulnerável em alguns tipos de encefalites virais, incluindo aquela induzida pelo vírus Piry (DE SOUSA et al., 2011), é necessário revermos a anatomia funcional desta estrutura.

## 1.4 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

Muitos estudos demonstram que o hipocampo, juntamente com outras estruturas do lobo temporal medial como os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal são as estruturas cerebrais mais envolvidas com os processos de memória e aprendizado. A formação hipocampal é definida como um complexo composto pelo giro denteado, hipocampo, *subiculum*, *pre-subiculum*, *parasubiculum* e córtex entorrinal (FALOUGY; BENUSKA, 2006). Uma organização característica das conexões entre as regiões do neocórtex é que elas são extensamente ligadas por conexões recíprocas, ou seja, se a região cortical A projeta para a região cortical B, a região B sempre envia projeções que retornam à região A. No entanto, a maior justificativa para o agrupamento das regiões que compõem a formação hipocampal consiste no fato destas estarem ligadas em parte por conexões unidirecionais que parecem uni-las como uma unidade funcional (INSAUSTI; AMARAL, 2004).

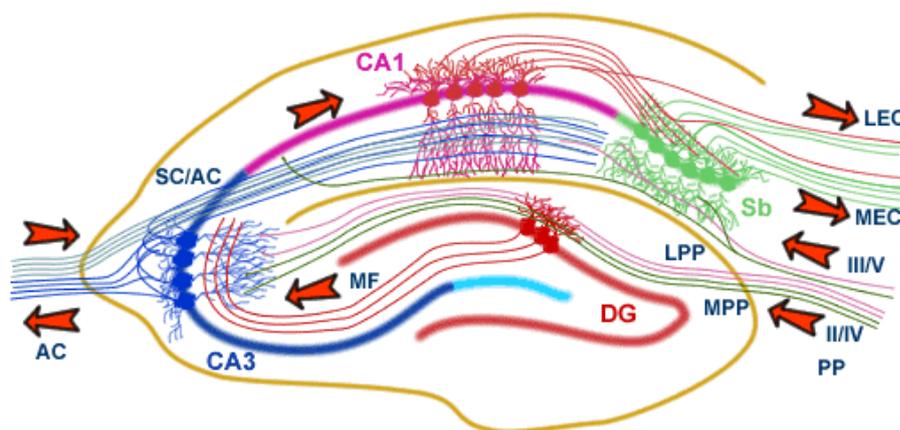
O hipocampo pode ser dividido em regiões denominadas Corno de Amon 1, 2, 3, e 4 (CA1-CA4): CA1 é a área mais próxima ao córtex entorrinal; CA2 é uma estreita região presente entre CA1 e CA3; CA3 é a região até a camada polimórfica do giro denteado; e CA4 é a área de CA3 que se insere no giro denteado. Outra nomenclatura, definida por Cajal, divide o hipocampo em região superior e região inferior (FALOUGY; BENUSKA, 2006).

Funcionalmente, o hipocampo pode ser dividido em dorsal (polo septal) e ventral (polo temporal). Estudos prévios mostraram que animais que tiveram o hipocampo dorsal lesionado apresentaram pior desempenho nos testes de memória espacial em relação aos animais com o hipocampo ventral lesionado e aos controles (ZHANG et al., 2004). Outros estudos mostraram que o hipocampo ventral está associado ao comportamento aversivo devido sua densa ligação com estruturas subcorticais como amígdala, hipotálamo e núcleo acumbens, envolvidos com a defesa e a emoção (TRIVEDI; COOVER, 2004).

O hipocampo e o giro denteado são formados por córtices tri-laminares. As camadas fundamentais do hipocampo são: camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*), camada lúcida (*stratum lucidum*) e a camada molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*). O giro denteado por sua vez é constituído pela camada polimórfica (*hilus*), camada granular (*stratum granulosum*) e camada molecular (*stratum moleculare*) (figura 4) (BROWN; ZADOR, 1990).

As principais aferências para o hipocampo e giro denteado são provenientes do córtex entorrinal, região septal e hipocampo contralateral. Existem várias outras regiões que projetam para o hipocampo com aferências menos densas, incluindo o tronco cerebral, hipotálamo, tálamo e amígdala (BROWN; ZADOR, 1990).

A organização funcional do hipocampo tem sido descrita como um circuito trissináptico básico. Neste circuito as fibras da via perforante, que se originam nas células das camadas II e III dos córtices entorrinal medial (não-olfatório) e lateral (olfatório), passam pelo *subiculum* e terminam nos dois terços mais externos da camada molecular do giro denteado. Neste ponto elas formam sinapses excitatórias com as células granulares do giro denteado. Estas, por sua vez, enviam seus axônios (fibras musgosas) para a região de CA3 onde realizam a segunda sinapse com os neurônios piramidais desta camada. Por fim, os axônios destas células piramidais (colaterais de Schaffer) formam a terceira sinapse com os neurônios piramidais de CA1 (figura 4) (BROWN; ZADOR, 1990). O córtex entorrinal também projeta para CA1 e CA3, cujos terminais estão presentes no *stratum lacunosum-moleculare*. As projeções do entorrinal para o *subiculum*, CA1 e CA3 são bilaterais e se originam predominantemente dos neurônios da camada III, mas um pequeno número de neurônios das camadas profundas também contribui para esta projeção (VAN GROEN; MIETTINEN; KADISH, 2003).



**Figura 4**-O circuito hipocampal: o hipocampo forma principalmente um circuito uni-direcional, com projeções do córtex entorrinal (EC) para o giro denteado (DG) através da via perforante (PP) e para CA3; o giro denteado envia projeções através das fibras musgosas (MF) para os neurônios piramidais de CA3, que enviam seus axônios para as células piramidais de CA1 pelos colaterais de Schaffer (SC), assim como as células de CA3 enviam projeções para o hipocampo contralateral pelas fibras comissurais (AC). Os neurônios de CA1 também recebem projeções diretamente da via perforante e enviam seus axônios para o subículo (Sb). Estes neurônios então enviam a principal saída do hipocampo para o córtex entorrinal, formando uma alça. LEC: Córtex entorrinal lateral; MEC: Córtex entorrinal medial. Fonte: <http://alfin2100.blogspot.com.br/2009/12/clues-on-short-term-memory-in.html>.

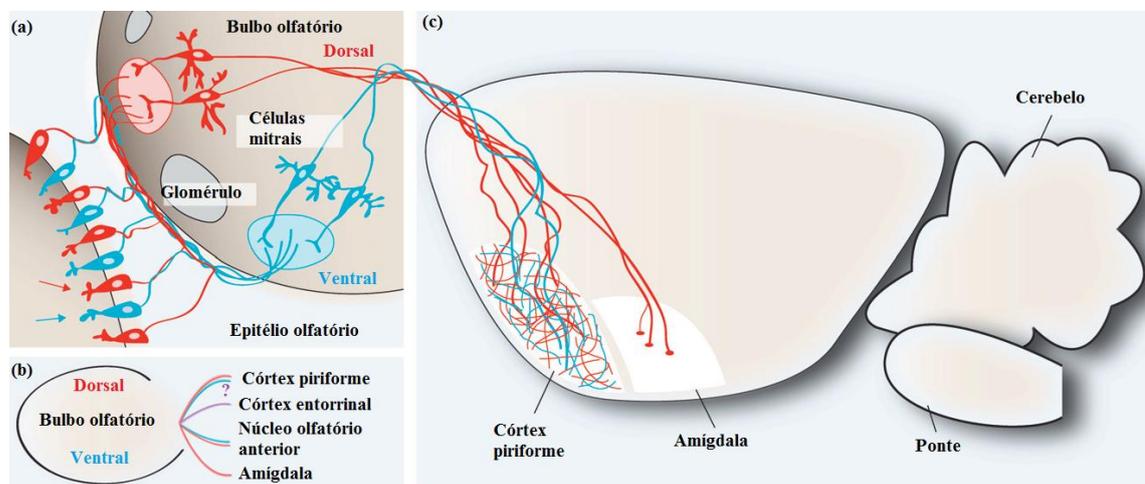
Fazendo uma breve descrição da organização laminar do hipocampo, pode-se dizer que a sua principal camada de células é chamada de *stratum pyramidale*. Esta camada contém os neurônios piramidais densamente empacotados em CA1 e mais fracamente empacotados em CA2 e CA3. A camada superior, contendo neurônios livremente dispersos é o *estratum oriens*, que possui os dendritos basais das células piramidais e algumas classes de interneurônios, como as células em cesto. O *estratum oriens* é definido como a camada onde ocorrem algumas das conexões entre as regiões de CA3 de ambos os lados (projeção comissural) e as conexões de CA3 para CA1 através dos colaterais de Schaffer. Na região de CA3, mas não em CA2 ou CA1, uma zona acelular, o *estratum lucidum*, está localizada logo abaixo a camada piramidal contendo as fibras musgosas que chegam do giro denteado. O *estratum radiatum* é localizado logo abaixo do *estratum lucidum* em CA3 e imediatamente abaixo da piramidal em CA2 e CA1, sendo uma região de conexões associativas entre as regiões de CA3 de ambos os lados e dos colaterais de Schaffer. Por fim, o *stratum lacunosum-moleculare* consiste em uma fina camada onde terminam as aferências provenientes do entorrinal e de outras regiões, como o núcleo medial do tálamo, contendo uma variedade de interneurônios que expressam o ácido gama-aminobutírico (GABA), cuja atividade forma um perfil espacial e temporal da célula de disparo principal (AMARAL; LAVENEX, 2007).

Um estudo recente mostrou que após a codificação da memória no hipocampo, os sinais de saída de CA3 através do circuito trissináptico são necessários para o processo de consolidação dessa memória (NAKASHIBA *et al.*, 2009). Além disso, o arbovírus Piry mostrou tropismo por regiões que compõem a via olfatória até o alcance do neocórtex em estruturas como a camada polimórfica do giro denteado e CA3, após uma infecção intranasal (DE SOUSA *et al.*, 2011). Dessa forma, sendo a região de CA3 uma das estruturas chaves do processo de consolidação da memória assim como uma região alvo da encefalite induzida por arbovírus, este trabalho trata da quantificação de células microgлияis na região de CA3 como forma de analisar a resposta inflamatória de animais que viveram em diferentes condições de alojamento. Tendo em conta que a via olfatória é uma das principais projeções onde se detectou a presença de antígenos virais na fase aguda da infecção pelo arbovírus Piry (DE SOUSA *et al.*, 2011), vale ressaltar sua organização morfofuncional.

## 1.5 SISTEMA OLFATÓRIO

A interação do homem com o meio ambiente é feita predominantemente através dos olhos, no entanto, na maioria das espécies, os estímulos odoríferos desempenham papéis importantes em funções fundamentais como alimentação, acasalamento, reprodução e organização social. Dessa forma, os invertebrados e os vertebrados desenvolveram sistemas complexos para detecção e discriminação de moléculas odoríferas.

A via olfatória se inicia com a ligação de partículas odoríferas aos receptores olfatórios presentes nos neurônios quimioceptores do epitélio olfatório. Curiosamente cada neurônio sensorial expressa somente um tipo de receptor e todos os neurônios que expressam o mesmo receptor projetam para o mesmo glomérulo no bulbo olfatório. Os dendritos apicais de células mitrais individuais formam sinapses com os axônios de neurônios sensoriais olfatórios dentro do glomérulo olfatório. As células mitrais, então, projetam-se para várias estruturas corticais e subcorticiais, dentre elas o córtex piriforme, o córtex entorrinal, o núcleo olfatório anterior e a amígdala (Figura 5, para revisão ver LEINWAND e CHALASANI, 2011).



**Figura 5-**(a) No camundongo, os neurônios sensoriais olfatórios projetam para um glomérulo específico inervado pelas células mitrais, que projetam para diferentes regiões cerebrais. (b) Esquema mostrando a origem e os alvos das projeções glomerulares. (c) Projeções para a amígdala são organizadas espacialmente, enquanto que as projeções para o córtex piriforme são distribuídas aleatoriamente por toda a região (adaptado de LEINWAND; CHALASANI, 2011).

Muitos estudos explicam a importância da relação entre a via olfatória e o hipocampo. Um trabalho realizado com gatos mostrou que, após a estimulação elétrica do córtex piriforme, as principais áreas responsivas ao estímulo são o giro denteado e CA3 (células

piramidais de CA1 e as células do *subiculum* também são ativadas, mas em menor proporção) (HABETS et al., 1980). Outro estudo realizado com humanos utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear revelou que o córtex olfatório primário (piriforme, entorrinal e amígdala) e o hipocampo apresentaram um aumento do sinal de oxigenação no início do estímulo seguido de uma redução significativa da perfusão sanguínea com a manutenção do estímulo, sugerindo que a conexão entre essas estruturas tem um papel importante no processo de habituação olfatória (POELLINGER et al., 2001).

Por outro lado, a conexão do córtex olfatório primário com o hipocampo é o substrato para a realização de tarefas complexas, como a orientação temporal pelo odor. Exemplo disso é a seletividade dos neurônios de CA1 e CA3 que disparam em intervalos específicos de apresentações de estímulos odoríferos subsequentes, indicando que o hipocampo tem a capacidade de controlar o tempo decorrido entre os mesmos (DESHMUKH; BHALLA, 2003). Animais com lesão hipocampal não perdem a capacidade de discriminar odores, mas têm o desempenho prejudicado quando a memória temporal para uma sequência de odores é necessária para a realização de uma tarefa, indicando que o hipocampo não está relacionado com a função sensorial olfatória, mas sim com a capacidade de relembrar e temporariamente armazenar um evento separado de outro evento pelo tempo (KESNER et al., 2002).

Dados adquiridos de centros clínicos sugerem que a infecção respiratória viral é a principal causa de anosmia/hiposmia em humanos (MOTT; LEOPOLD, 1991). Embora os casos em humanos suportem essa ideia de disfunção olfatória induzida por infecção viral, as bases patogênicas dessa perda sensorial permanecem desconhecidas. Os trabalhos experimentais em camundongos que investigaram essa perda utilizaram principalmente linhagens de coronavírus, principal causa de constipação/resfriado, mostrando que esses vírus têm a capacidade de se espalhar pelo SNC, provocando encefalite fatal ou encefalopatia persistente após inoculação intranasal (BARTHOLD, 1988; PERLMAN et al., 1989). Seguindo a mesma abordagem e àquela de De Sousa et al., 2011, utilizamos o arbovírus Piry, também capaz de provocar encefalite, investigando na fase aguda da doença o comprometimento de tarefas hipocampo-dependentes e sua possível neuroproteção pelo enriquecimento ambiental.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Investigar o papel do enriquecimento ambiental sobre uma encefalite aguda induzida pelo arbovírus Piry, através de análise neuropatológica e comportamental.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações neuropatológicas através de imuno-histoquímicas para anti-Piry e anti-Iba-1.
- Estudar as alterações comportamentais através de tarefas hipocampo-dependentes durante três janelas temporais: 3,7 ou 10 dias após inoculação.
- Estimar o número de células microgliais nas camadas de CA3 para todos os grupos experimentais, buscando uma possível correlação entre os achados neuropatológicos e comportamentais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos adotados neste trabalho foram previamente submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE/UFPA nº 1701/05), tendo seus procedimentos experimentais integralmente aprovados.

Para o desenvolvimento dos objetivos propostos, este trabalho avaliou o impacto do enriquecimento ambiental sobre alterações comportamentais e neuropatológicas em camundongos infectados pelo arbovírus Piry em diferentes janelas temporais após a inoculação (pi). Os camundongos utilizados foram fornecidos pelo Instituto Evandro Chagas e manipulados de acordo com os “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH) nas instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará.

#### 3.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS E ALOJAMENTO

Para compor os grupos experimentais foram utilizados 56 (cinquenta e seis) camundongos suíços albinos fêmeas a partir de três meses de idade. Os animais foram então alojados em ambiente enriquecido (EE) ou em ambiente empobrecido (IE) durante seis meses completando, portanto, nove meses na fase final dos experimentos. Os animais do grupo EE (n=28) foram alojados em gaiolas de plástico (32x39x16,5cm), com cerca de dez camundongos por gaiola, equipada com rodinhas de correr, túneis e objetos variados de plástico, metal ou papelão, sendo estes trocados ou realocados uma vez por semana para estimular a atividade exploratória. Os animais do grupo IE (n=28) foram mantidos em gaiolas de plástico, também com cerca de dez animais por gaiola e com o mínimo estímulo ambiental possível (Figura 6). Ambos os ambientes eram forrados com palha de arroz autoclavada, trocada uma vez por semana. Os animais tiveram acesso livre à água e comida e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h.



**Figura 6**-Ilustrações do ambiente enriquecido (EE) equipado com rodinhas de correr e objetos de cores e formas diferentes (A), e do ambiente empobrecido (IE) com redução de estímulos multisensoriais (B).

### 3.2 PROCEDIMENTOS PARA INOCULAÇÃO VIRAL

Para preparar o homogenado cerebral contendo o vírus, 0,02 mL de suspensão viral foram primeiramente inoculados de forma intracerebral em camundongos recém-nascidos, sendo estes diariamente observados. Na presença dos primeiros sinais clínicos, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico 2,2,2-tribromoetanol e imediatamente estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o tecido cerebral (0,2g/animal) foi triturado e misturado com 1,8mL de solução tampão fosfato salina (PBS) contendo 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina (para evitar contaminação secundária provocada por outros microrganismos). A suspensão foi então, centrifugada a  $4^{\circ}\text{C}$  e 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante congelado e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , originando uma solução estoque a 20%. Esta solução foi titulada a  $10^{-5}$  com a mesma solução antibiótica e o homogenado de cérebro normal foi preparado da mesma maneira, mas contendo cérebro de neonato sem infecção.

Para a inoculação cada camundongo foi previamente anestesiado com 2,2,2-tribromoetanol a 2% (0,08mL/5g) e inoculado com  $5\mu\text{l}$  da suspensão de homogenado de cérebro infectado (PY) ou do homogenado de cérebro normal (NBH) em cada narina. Após o procedimento, os animais foram realojados nos seguintes grupos: ambiente enriquecido infectado (EOPY, n=21), ambiente enriquecido controle (EENBH, n=8), ambiente empobrecido infectado (IEPY, n=21), ambiente empobrecido controle (IENBH, n=8). Os animais foram mantidos nessas condições até o período de sobrevivência desejado (3, 7 ou 10 dias pi). Três e dois dias antes da inoculação os animais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliar o comportamento dos grupos antes da infecção, em um procedimento chamado de *baseline* (Figura 7).

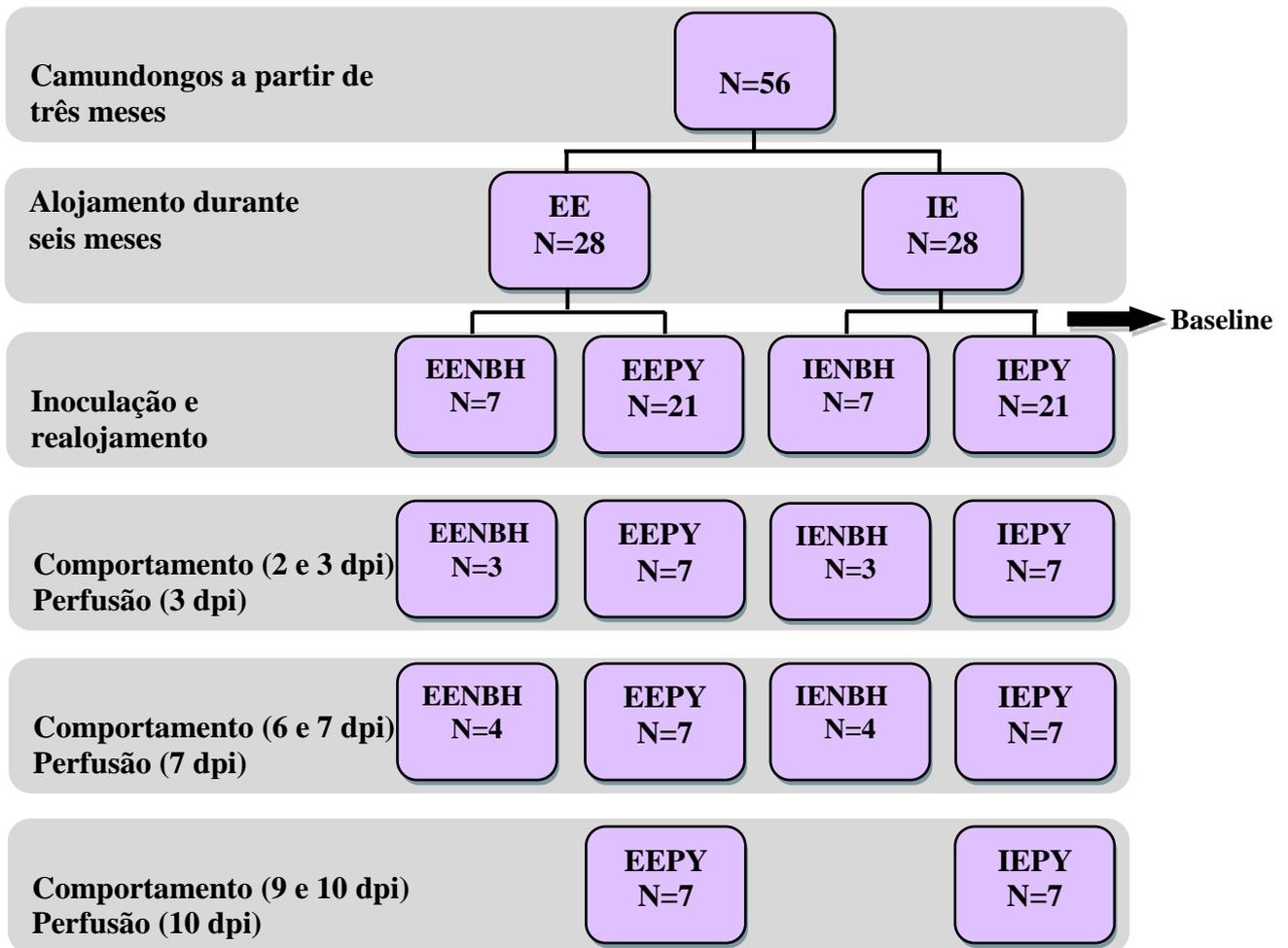


Figura 7-Distribuição dos animais em cada grupo experimental.

### 3.3 TESTE DE REMOÇÃO E ESTOCAGEM DE COMIDA (*BURROWING*)

O teste definido em Inglês como *burrowing* avalia o comportamento natural de alguns roedores em remover e estocar comida a partir de uma toca, tendo uma sensibilidade importante na detecção de algumas disfunções crônicas, como a provocada por doença príon, infecção por LPS (lipopolissacarídeos) ou lesões em estruturas cerebrais, como o hipocampo. É um teste de fácil execução cujo aparato tem baixo custo e pode ser facilmente construído (DEACON, 2006; DEACON, 2009).

Inúmeros estudos mostram que a atividade de *burrowing* é hipocampo-dependente, exemplo disso é o fato da redução desta ser um indicador sensível, simples e objetivo para a detecção pré-clínica da doença príon em animais infectados com scrapie (DEACON et al., 2001), ME7 (BORNER et al., 2011) e também em animais infectados com arbovírus (SOUSA

et al., 2010). Essas detecções parecem estar relacionadas com alterações afetivas e emocionais (CUNNINGHAM, 2005).

Três dias antes da infecção e, dois, seis e nove dias pós-infecção (p.i.) os animais foram colocados individualmente em gaiolas de plástico (32cm x 39cm x 16,5cm) contendo um tubo de PVC (20cm x 7,2cm) preenchido com 150g de ração utilizada na dieta dos camundongos. O tubo era disposto de forma inclinada e a sua abertura estava à 3cm do solo (Figura 8). Após o teste, com duração de cerca de duas horas e sempre realizado durante a manhã, cada animal retornava à sua gaiola coletiva e a atividade de *burrowing* era avaliada pela diferença entre a quantidade de ração que havia no tubo antes e após o teste (DEACON, 2009).



**Figura 8-**Aparato utilizado para a realização do teste de *burrowing*.

#### 3.4 ATIVIDADE DE CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

Outro teste hipocampo-dependente realizado foi a atividade de campo aberto, que avalia a atividade motora. O aumento da atividade no campo aberto pode representar também uma alteração cognitiva, que faz com que o animal doente permaneça explorando a área de teste, enquanto o animal são se habitua gradualmente ao ambiente, explorando-o cada vez menos. A ansiedade gerada por um ambiente novo pode ser mais um componente que justifica a maior exploração do ambiente pelos animais doentes (CUNNINGHAM, 2005)

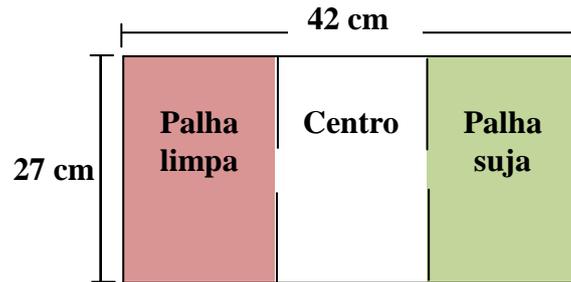
Dois dias antes da infecção, e no terceiro, sétimo e décimo dia após a inoculação viral, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, como instrumento para avaliação da atividade exploratória dos mesmos. O animal era colocado no centro de um aparato fechado com quatro paredes (30x30x40 cm), revestidas com fórmica branca e assoalho revestido com

fórmica preta, sendo esta dividida em nove quadrados de 10cm de lado. Durante cinco minutos filmou-se o comportamento do animal com o auxílio de uma câmera posicionada sobre o aparato. As imagens foram posteriormente analisadas pelo programa Any-Maze (Stoelting®), avaliando-se os seguintes parâmetros: número de linhas cruzadas, tempo imóvel e tempo na zona central do aparato. Após cada teste o aparato foi limpo com álcool a 70% para remoção de pistas olfatórias.

### 3.5 TESTE DE DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA

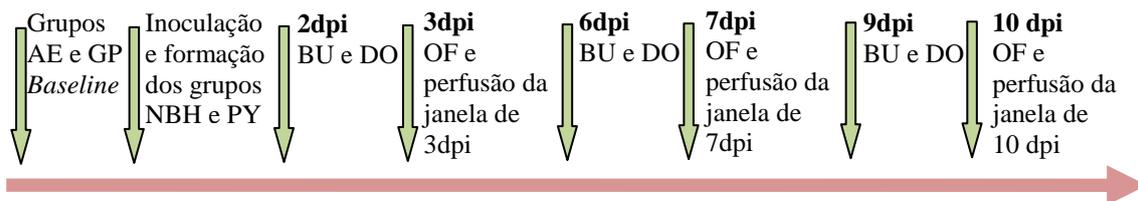
O teste de discriminação olfatória foi previamente descrito por Soffié e Lamberty (1988) e avalia a capacidade do animal de diferenciar odores. Esse teste foi utilizado com base no trabalho de Carret al. (1976), que mostrou a preferência significativa dos ratos adultos pelo seu próprio cheiro ao invés do cheiro de outros animais. Neste trabalho é demonstrado que o uso do antagonista colinérgico escopolamina compromete a discriminação olfatória, deixando os animais inoculados com o antagonista incapazes de reconhecer a palha familiar quando comparados aos controles, que continuam capazes de discriminá-la. Além disso, esse trabalho mostrou que as vias colinérgicas que partem da via olfatória para outras regiões centrais têm um papel fundamental nesse tipo de reconhecimento (SOFFIÉ; LAMBERTY, 1988).

Para a realização do teste, a palha autoclavada das gaiolas era trocada 48 horas antes da realização do teste para que o odor dos animais pudesse impregná-la. No primeiro dia do teste (*baseline*) foi realizada uma fase de adaptação ao aparato, na qual cada animal foi colocado no aparato do teste durante dois minutos sem a presença da palha. Após a adaptação ser feita para todos os animais, o teste foi realizado em uma caixa dividida em três compartimentos (um central, um contendo palha suja e o outro contendo palha limpa), separados por duas paredes contendo uma porta de 5cm<sup>2</sup> cada (Figura 9). O animal era colocado no compartimento central de frente para a parede e o seu comportamento era filmado por uma câmera localizada sobre o aparato, durante 5 minutos. Após cada teste o aparato era limpo com álcool a 70% com o objetivo de se remover pistas olfatórias. Como índice de discriminação olfatória avaliou-se o tempo gasto nos compartimentos contendo a palha suja e a palha limpa através do programa Any-Maze (Stoelting®), e analisou-se em qual dos compartimentos contendo palha o animal optava como primeira escolha.



**Figura 9**-Esquema mostrando o aparato utilizado para realizar o teste de discriminação olfatória.

A figura 10 representa um esquema das etapas realizadas neste trabalho desde o alojamento até a perfusão dos grupos em cada janela temporal, ressaltando-se que por questão de tempo a atividade de *burrowing* e o teste de discriminação olfatória foram realizados um dia antes da perfusão, enquanto que o campo aberto foi realizado no mesmo dia do sacrifício dos animais.



**Figura 10**-Desenho experimental adotado neste trabalho (BU-Burrowing; DO-Discriminação olfatória; OF-Open field; dpi-Dias pós-inoculação).

### 3.6 PERFUSÃO E PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

No terceiro, sétimo e décimo dias pós-inoculação, os animais foram pesados e anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol por via intraperitoneal (0,08ml/5g). Em seguida, os animais foram perfundidos transcárdiacamente com solução salina 0,9% heparinizada (5000UI/l), seguida de paraformaldeído a 4% feito em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4). Posteriormente os encéfalos foram removidos, e os hemisférios separados e submetidos a pós-fixação por 24hs em paraformaldeído a 4%. As secções foram obtidas em vibrátomo (Micron®) no plano parasagital a 70µm de espessura, ordenadas em série anatômica (1:6) e armazenadas em paraformaldeído a 2% até serem utilizadas. Para as imunomarcações utilizaram-se os anticorpos Anti-Piry (para antígenos virais) e Anti-Iba-1 (como marcador de micróglia e macrófago).

### *Imunohistoquímica para Anti-Piry*

A imunohistoquímica para detecção dos antígenos virais na estrutura cerebral dos camundongos foi realizada em todos os animais infectados, sendo o anticorpo policlonal anti-Piry fornecido pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) de acordo com protocolos previamente publicados (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2001; DINIZ et al., 2006).

As secções foram lavadas em tampão fosfato 0,1M e então, incubadas em ácido bórico 0,2M pH 9,0 a 70° C por uma hora, para recuperação dos sítios antigênicos. Em seguida, as secções foram lavadas em tampão fosfato salina (PBS) a 0,1M com Triton X-100 5% (PBST 5%) e incubadas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 1% durante 10 minutos. Após lavagem em PBS, seguiu-se o protocolo Mouse-on-Mouse Blocking Kit (M.O.M. kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA): as secções foram incubadas na solução bloqueadora MOM IgG blocking por uma hora, lavadas em PBS, e incubadas por 5 minutos no diluente do MOM kit. A incubação no anticorpo primário (Piry 1:20) foi feita por 72 horas, seguida de lavagem em PBS e incubação no anticorpo secundário, MOM Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent, por 12 horas. Após tal procedimento, as secções foram lavadas com PBS e incubadas no complexo avidina-biotina-peroxidase ABC (Vector Laboratories) por 1 hora, para permitir a ligação de moléculas de peroxidase ao anticorpo secundário através da reação de alta afinidade entre avidina e biotina. As secções foram novamente lavadas com PB 0,1M, e após serem incubadas em tampão acetato 0,2M pH 6,0 por 5 minutos, foram reveladas com a solução de GND (3,3'-diaminobenzidina 0,6mg/mL, cloreto de níquel 2,5mg/mL e glucose oxidase) que libera o oxigênio necessário à reação de peroxidação e precipitação do cromógeno. Para interromper a reação foi utilizado PB 0,1M (Quadro 1).

Soluções	Número de lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (hora)
Ácido Bórico 0,2M (70 °C pH 9 )	1		1
PBST 5%	3	5	
Metanol + Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a 1%	1	10	
PBS	3	2	
MOM IgG Block (3 gotas de solução de trabalho + 10mL PBS)	1		1
PBS	3	2	
Solução de trabalho (200µl de proteína concentrada + 10mL de PBS)	1	5	
Anticorpo primário Anti-Piry a 4° C na diluição de 1:20 no concentrado de proteína (500µl + 10mL de solução de concentrado de proteína)	1		72
PBS	3	2	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG (45µl de Biotinylated IgG em 10mL da solução de trabalho)	1		12
PBS	3	2	
ABC	1		1
PB 0,1M	3	2	
GND	1	Até 30	
PB 0,1M	3	2	

**Quadro 1-**Protocolo da reação de imunohistoquímica para detecção dos antígenos virais.

### *Imunohistoquímica para Micróglia/Macrófagos*

As secções para processamento foram previamente lavadas em tampão Tris 0,1M e incubadas em ácido bórico 0,2M pH 9,0 a 70° C por uma hora para recuperação dos sítios antigênicos. Em seguida, as secções foram lavadas em tampão Tris salina (TBS) a 0,1M com Triton X-100 5% (TBST 5%) durante cinco minutos e lavadas em TBS durante 2 minutos. Após lavagem em TBS, as secções foram incubadas na solução de caseína a 10% por uma hora, a fim de diminuir a marcação inespecífica, e então, foram lavadas em TBS e incubadas no anticorpo primário Anti-Iba1 (Wako, Japão), na diluição de 1:500, por 72 horas.

Posteriormente, as secções foram lavadas em TBS e incubadas no anticorpo secundário Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent por 12 horas, seguida de incubação no peróxido de hidrogênio a 30%, lavagem em TBS e incubação no ABC por uma hora. A revelação foi realizada da mesma forma como descrita para imunohistoquímica para antígenos virais (Quadro 2).

Soluções	Número de lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (hora)
Ácido Bórico 0,2M (70 °C pH 9 )	1		1
TBST 5%	3	5	
TBS	3	2	
Caseína 10% (1mL de caseína + 9mL de água)	1		1
TBS	3	2	
Anticorpo primário Anti-Iba1 na diluição de 1:500 em TBS	1		72
TBS	3	2	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG (45µl de Biotinylated IgG em 10mL da solução de trabalho)	1		12
Peróxido de hidrogênio a 30% em água	1	15	
TBS	3	2	
ABC	1		1
TRIS 0,1M	3	2	
GND		Até 30 minutos	
TRIS 0,1M	3	2	

**Quadro 2-**Protocolo da reação de imunohistoquímica para Anti-Iba1.

#### *Contracoloração com Nissl*

Após as imunomarcações para Anti-Iba-1, as secções foram contracoradas com Nissl, utilizando o cresil violeta a 0,5%. Esta coloração evidencia núcleos e nucléolos de neurônios e células gliais de forma distinta facilitando, portanto, a delimitação laminar das camadas necessárias para a análise estereológica adotada neste trabalho.

As lâminas contendo as secções imunoreagidas para Anti-Iba-1 foram mergulhadas nas soluções conforme o protocolo descrito no quadro 3 e posteriormente foram seladas com lamínula e meio de inclusão (Entelan - Merck®).

Soluções	Tempo
Etanol 90%	1 minuto
Etanol 70%	1 minuto
Etanol 50%	1 minuto
H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> COOH	2 minutos
Cresil violeta 0,5%	1 minuto
Etanol 70%	15 segundos
Etanol 90% + CH <sub>3</sub> COOH (3 gotas de CH <sub>3</sub> COOH para 100mL de etanol 90%)	15 segundos
Etanol 100% I	3 minutos
Etanol 100% II	3 minutos
Xilol + Etanol 100% (1:1)	3 minutos
Xilol I	3 minutos
Xilol II	3 minutos

**Quadro 3-**Protocolo empregado para a contracoloração com Nissl.

### 3.7 FOTOMICROGRAFIAS

Para obtenção das fotomicrografias, foi utilizada uma câmera digital (Microfire, Optronics, CA, USA) acoplada a um microscópio Nikon (Optiphot-2, N.Y., USA). As imagens foram processadas usando o programa Adobe Photoshop 7.0.1 C.S.2 (San Jose, CA, USA) para ajuste de brilho e contraste e as regiões fotografadas foram escolhidas de forma semelhante para cada grupo experimental, ilustrando resultados que mais se aproximam da média de cada grupo.

### 3.8 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Na análise qualitativa utilizam-se descrições envolvendo termos como “grande”, “pequeno”, “muito”, “pouco”, “ausente” ou “presente”, sendo útil para estabelecer diferenças entre um estado patológico e um estado normal. Porém, esta análise não é suficiente para estabelecer mudanças estatísticas, principalmente quando as diferenças são discretas.

A estereologia é um termo designado para descrever métodos que fazem uma interpretação tridimensional a partir de observações de secções bidimensionais analisando-se características teciduais, como volume, área, número, conectividade, distribuição espacial e comprimento de estruturas biológicas (SCHMITZ; HOF, 2005).

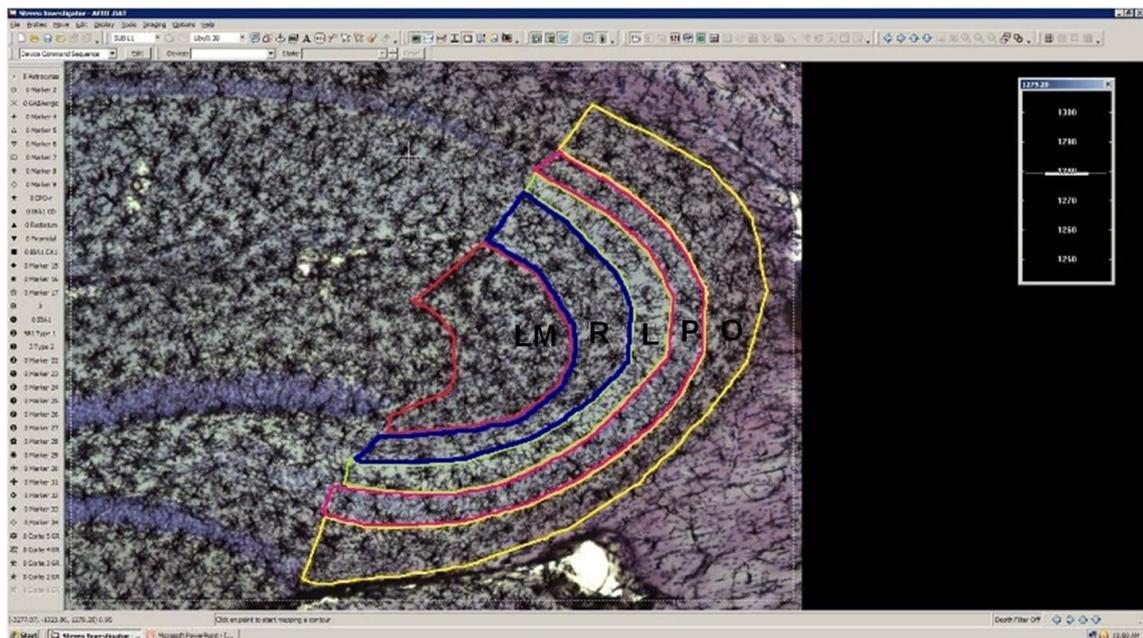
Os métodos estereológicos recentes têm muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais, uma vez que os esquemas de amostragem são definidos *a priori*, de tal forma que não são necessárias informações sobre tamanho, forma, orientação e distribuição dos objetos a serem contados. Essa estereologia, baseada em *design*, elimina a necessidade de informação sobre a geometria dos objetos de interesse e fornece dados mais satisfatórios por eliminar potenciais fontes de erros sistemáticos (WEST, 2002).

A análise quantitativa do número de micróglias ativadas em CA3 de camundongos infectados e controles que viveram sob diferentes condições ambientais foi realizada através do método do fracionador óptico, obtendo-se o número mínimo de quatro animais quantificados por grupo. O fracionador óptico é a combinação do *dissector óptico* com o *fracionador de amostras*. Nessa técnica, o hipocampo é seccionado e os objetos de interesse, contidos na amostra sistemática e aleatória de uma fração conhecida da região, são contados. As principais vantagens do método estão relacionadas ao fato deste não ser afetado pela retração do tecido e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais e que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento (WETS; SLOMIANKA; GUNDERSEN, 1991).

Cada uma das camadas de CA3 (*stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum lucidum*, *stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*) foi delimitada utilizando-se a contracoloração para facilitar a diferenciação das camadas na objetiva 3.2x de um microscópio óptico (Nikon, Japan) equipado com placa motorizada (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para os eixos X, Y e Z. Este sistema foi acoplado a um computador contendo o programa Stereoinvestigator (MicroBrightField, Williston, VT,

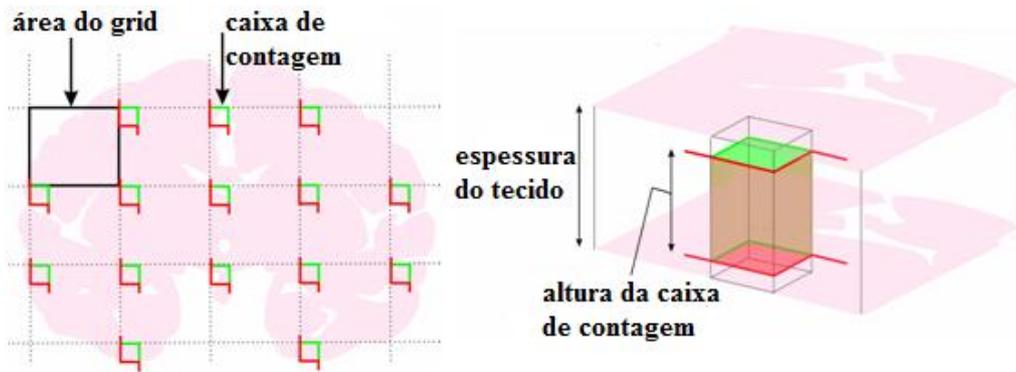
USA), que registra as coordenadas tridimensionais e armazena os dados estereológicos. Para detectar os objetos de interesse foi utilizada a objetiva de 100x.

Toda análise estereológica é iniciada com a delimitação da região de interesse, e neste trabalho, utilizou-se secções parassagittais nas quais as camadas de CA3 foram bem estabelecidas (Figura 11). Após a delimitação da área de interesse, uma matriz de contagem previamente determinada é sobreposta na área estudada e blocos de contagem são inseridos de forma igualmente espaçada nas interseções desta matriz.



**Figura 11**-Delimitação das camadas de CA3 através do fracionador óptico (O-stratum oriens; P-stratum pyramidale; L-stratum lucidum; R-stratum radiatum; LM-stratum lacunosum-moleculare).

Cada bloco de contagem possui duas linhas de inclusão (verdes), duas linhas de exclusão (vermelhas) e uma determinada altura  $h$  (*counting frame height*, Figura 12). A espessura da secção é cuidadosamente medida a cada bloco de contagem através do movimento do foco fino do microscópio em direção ao topo e à base da secção. Para garantir que o processamento histológico do tecido não interfira na determinação dos objetos de interesse, aplica-se uma zona de guarda, ou seja, uma distância mínima do topo da secção a partir da qual o bloco de contagem é inserido. Assim, todos os objetos que estiverem inseridos dentro do bloco de contagem e não estiverem em contato com as linhas de exclusão são quantificados.



**Figura 12**-Caixas de contagem com as linhas de inclusão (verde) e exclusão (vermelha), nas interseções do grid de contagem. À direita, representação tridimensional da caixa de contagem com a sua altura em relação à espessura do tecido. Adaptado de [www.uhnresearch.ca/wcif](http://www.uhnresearch.ca/wcif).

Os parâmetros estereológicos adotados para contagem de micróglia em cada camada de CA3 estão representados na tabela 1.

**Tabela 1: Parâmetros utilizados para contagem de micróglia em CA3 utilizando o fracionador óptico.**

Área de Interesse	Caixa (x,y) ( $\mu\text{m}^2$ )	Matriz ( $\mu\text{m}^2$ )	Espessura do bloco (z)	Zona de Guarda
CA3- <i>stratum oriens</i>	60 x 60	90 x 90	8 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$ do topo
CA3- <i>stratum pyramidale</i>	80 x 80	80 x 80	8 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$ do topo
CA3- <i>stratum lucidum</i>	80 x 80	80 x 80	8 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$ do topo
CA3- <i>stratum radiatum</i>	60 x 60	90 x 90	8 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$ do topo
CA3- <i>lacunosum-moleculare</i>	80 x 80	80 x 80	8 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$ do topo

A determinação do número de micróglia pelo fracionador óptico é baseada na distribuição aleatória e sistemática de secções seriadas, todas com a mesma probabilidade de contribuir para a amostra. Dessa forma, a estimativa total é obtida pela seguinte fórmula:

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

Onde:

N – número total de células

$\Sigma Q$  – número de células contadas

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

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

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

Os tamanhos dos blocos e das matrizes de contagem variaram de acordo com a camada analisada, a partir de experimento piloto prévio, de forma a se obter um coeficiente de erro (CE) aceitável. O cálculo do coeficiente de erro foi baseado em estudos prévios com validação do CE de Scheaffer. Além disso, o coeficiente de variação biológica (CVB) foi calculado para garantir a precisão da metodologia adotada. Como regra geral, a variância introduzida pela estereologia não deve ser superior a 50% da variância observada em um grupo, ou seja, a relação entre o coeficiente de erro e coeficiente de variação do grupo deve ser inferior a 0,5 ( $CE^2/CV^2 < 0,5$ ). Isto garante que a diferença encontrada entre os animais que formam determinado grupo esteja relacionada à heterogeneidade de cada grupo e não a uma falha do método estereológico. No entanto, é válido ressaltar que na presença de um grupo homogêneo esta regra não se aplica, observando-se, portanto, uma relação de  $CE^2/CV^2 > 0,5$ , mesmo com o coeficiente de erro contribuindo com menos de 50% para a variância do grupo (SLOMIANKA; WEST, 2005).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os grupos de animais foram tratados por testes de normalidade para a identificação de possíveis valores extremos baseados nos desvios, tendo os valores extremos sido eliminados do conjunto de dados.

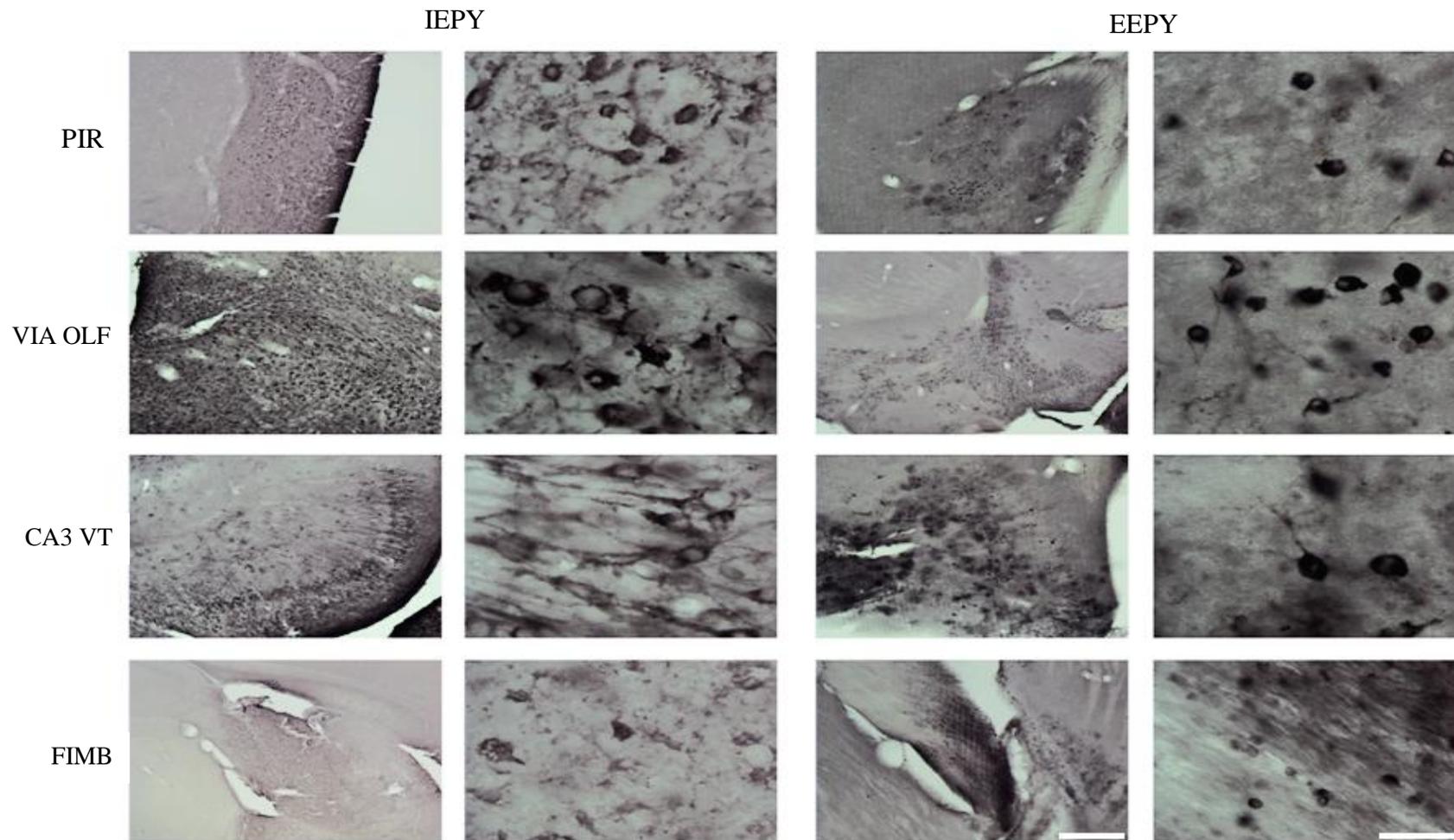
Os resultados obtidos pelos programas StereoInvestigator, Any-Maze e da atividade de *burrowing* foram analisados estatisticamente através do programa BioEstat 5.0. Utilizou-se o teste paramétrico ANOVA um critério, com o teste Bonferroni *a priori* para estabelecer diferenças entre os grupos, aceitando-se como significantes os resultados com um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS

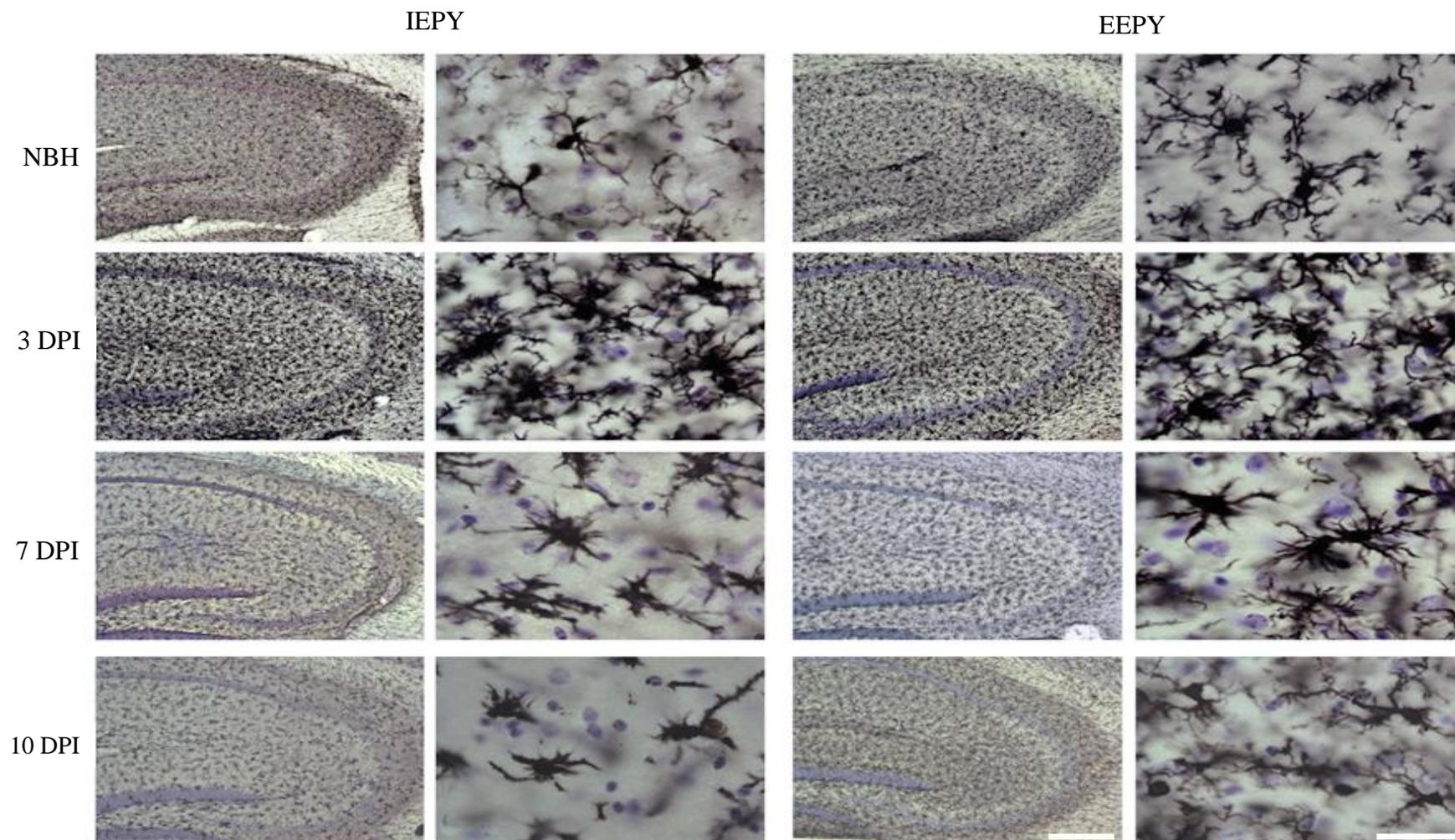
### 4.1 NEUROPATOLOGIA

Os achados neuropatológicos reproduziram os dados obtidos por De Sousa et al. (2011), mostrando que o vírus invade o SNC através das vias olfatórias, iniciando pelo bulbo olfatório em direção ao córtex piriforme e amígdala, até atingir áreas corticais superiores como o hipocampo ventral. A marcação dos antígenos virais foi encontrada na segunda janela temporal (7 dpi), correlacionando-se com as principais alterações comportamentais descritas abaixo. A figura 13 ilustra a marcação viral no córtex piriforme, CA3 ventral e fimbria nos grupos infectados aos sete dias revelando que ambos foram afetados pela infecção viral, embora a marcação no grupo IEPY sugira uma infecção mais evidente que no grupo EEPY.

A figura 14 revela a marcação de micróglias/macrófagos nos grupos controles e nos grupos infectados nas três janelas temporais, na qual se observa a mudança no padrão de ativação das células gliais como indicadores de resposta inflamatória. Pode-se observar que os animais já apresentaram os primeiros sinais de ativação logo no terceiro dia e que esta se mostrou mais intensa no sétimo dia em ambos os grupos. No entanto, no grupo IEPY constatou-se que o formato ameboide da micróglia inflamatória permaneceu até o décimo dia, enquanto que no grupo EEPY a ativação microglial mostrou-se menos intensa.



**Figura 13**-Fotomicrografias das células infectadas pelo arbovírus Piry ao longo da via olfatória nos grupos IEPY e EEPY aos 7 dpi PIR: piriforme; VIA OLF: via olfatória; CA3 VT: CA3 ventral; FIMB: fimbria. Escalas: menor aumento (250µm); maior aumento (25µm).

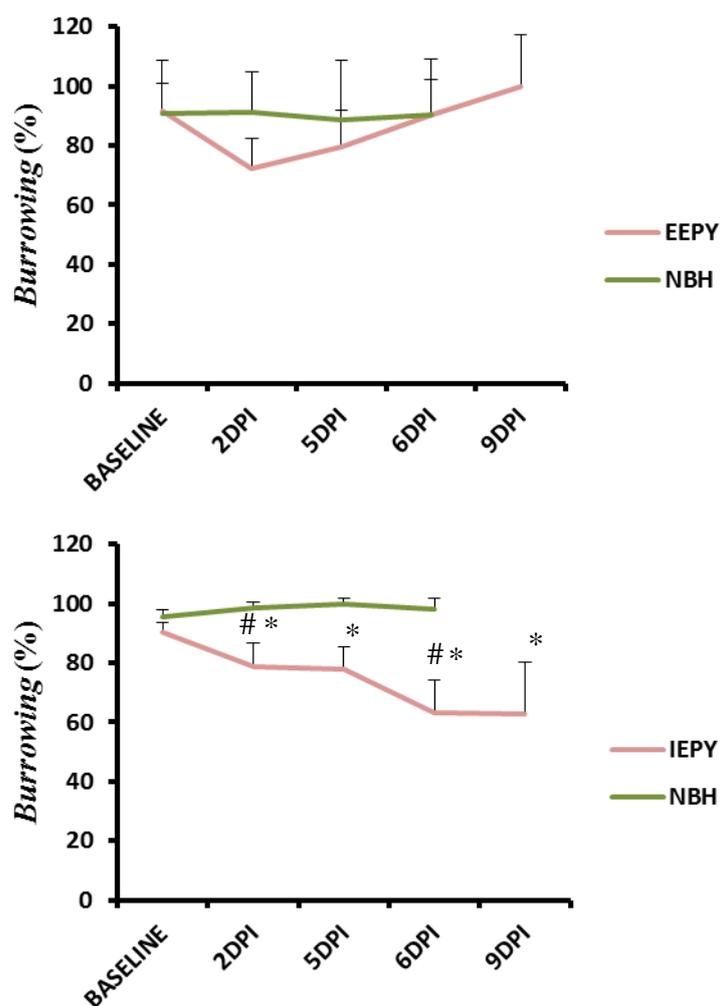


**Figura 14**-Fotomicrografias de secções imunoreagidas para anti-Iba-1 dos grupos controles e dos grupos infectados nas três janelas temporais em CA3. Escalas: 250 $\mu$ m (menor aumento) e 25 $\mu$ m (maior aumento).

## 4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.2.1 Atividade de *Burrowing*

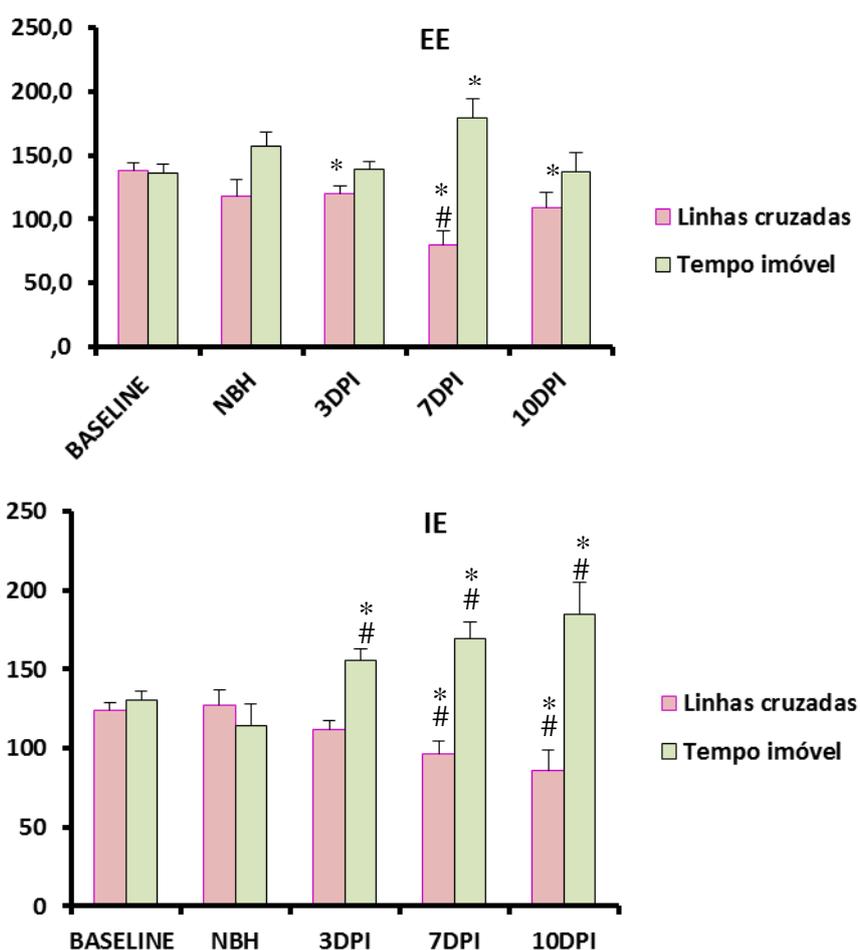
A figura 15 mostra o desempenho dos grupos experimentais em cada janela temporal na atividade de *burrowing*. Pode-se observar que não houve diferença significativa nos animais infectados do ambiente enriquecido tanto em relação ao *baseline* quanto em relação ao grupo controle (NBH). Já nos animais infectado do ambiente empobrecido, houve uma redução significativa já no segundo dia após a inoculação, tanto em relação ao *baseline* quanto ao NBH. Além disso, a atividade continuou caindo até o sexto dia, permanecendo baixa até o nono dia após a inoculação em relação ao *baseline*.



**Figura 15**-Gráficos mostrando a atividade de *Burrowing* dos grupos experimentais em relação ao NBH em cada janela temporal. (\*) diferença significativa em relação ao *baseline*; (#) diferença significativa em relação ao NBH ( $p < 0,05$ , ANOVA um critério).

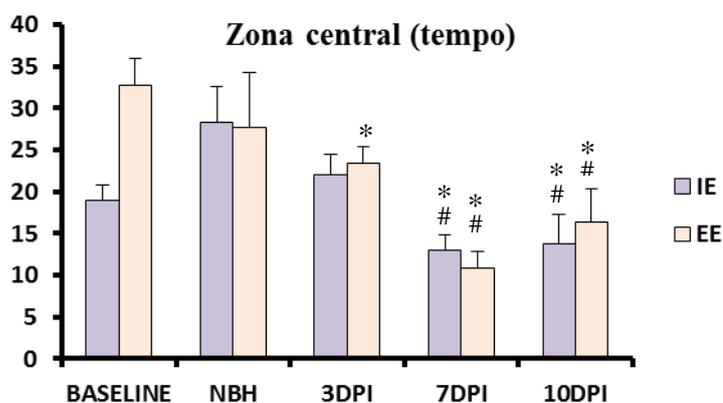
#### 4.2.2 Atividade de campo aberto (*Open Field*)

A figura 16 mostra o desempenho dos grupos experimentais no campo aberto 3,7 e 10 dias após a inoculação, utilizando como parâmetros o número de linhas cruzadas e o tempo imóvel no aparato. Os animais do grupo EE mostraram as principais alterações comportamentais aos 7 dpi, com redução do número de linhas cruzadas e aumento do tempo imóvel. Já no grupo IE, essas alterações iniciaram aos 7 dpi e permaneceram alteradas aos 10 dpi, mostrando que assim como na atividade de *burrowing*, o grupo de ambiente empobrecido foi mais afetado que o grupo enriquecido.



**Figura 16**-Atividade de campo aberto (número de linhas cruzadas e tempo imóvel) de cada grupo experimental nas janelas temporais testadas. (\*) diferença significativa em relação ao *baseline*; (#) diferença significativa em relação ao NBH ( $p < 0,05$ , ANOVA um critério).

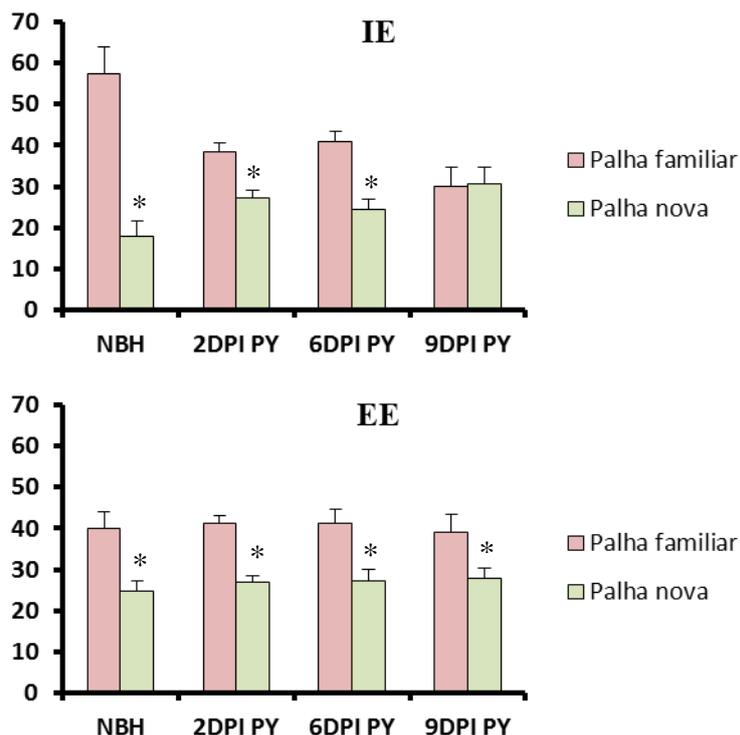
A figura 17 mostra o tempo que os animais de todos os grupos testados permaneceram na zona central do aparato do teste de campo aberto em todas as janelas temporais analisadas.



**Figura 17-**Atividade de campo aberto (tempo na zona central) de cada grupo experimental nas janelas temporais testadas. (\*) diferença significativa em relação ao baseline; (#) diferença significativa em relação ao NBH ( $p < 0,05$ , ANOVA um critério).

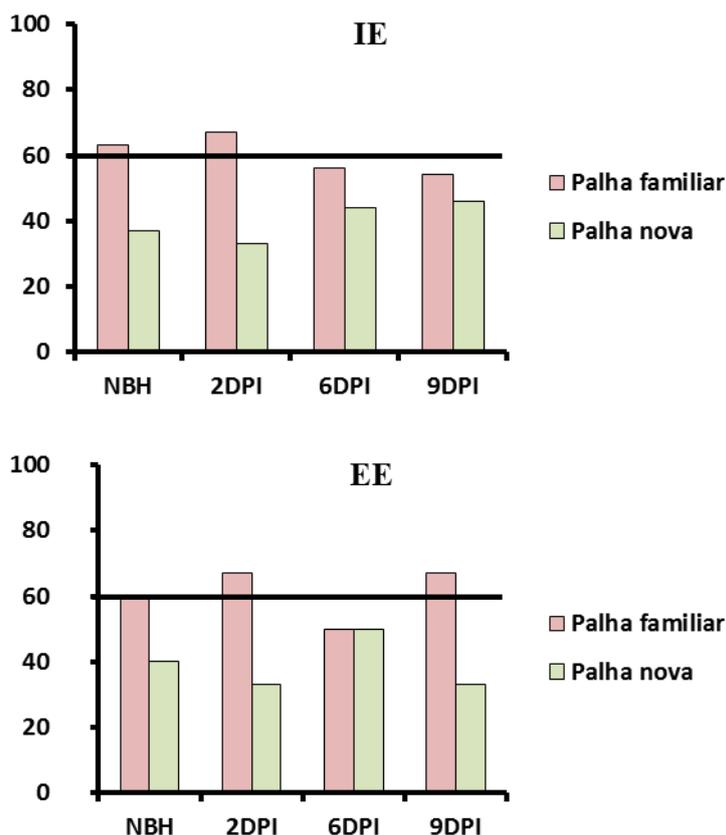
#### 4.2.3 Discriminação olfatória

Na análise da capacidade de discriminação olfatória dos animais testados, verificou-se a significância estatística entre os tempos gastos na palha familiar e na palha nova, independente da preferência do animal por um dos odores. A figura 18 mostra que os animais do grupo EE conseguiram discriminar os odores em todas as janelas analisadas, enquanto que os animais do grupo IE apresentaram um déficit na atividade discriminatória apenas aos 9 dias após a inoculação, mostrando portanto, uma alteração tardia em relação aos testes de *burrowing* e de campo aberto.



**Figura 18**-Discriminação olfatória dos animais dos grupos IE e EE aos 2,6 e 9 dias após a inoculação viral. (\*)  $P < 0,05$  (ANOVA um critério).

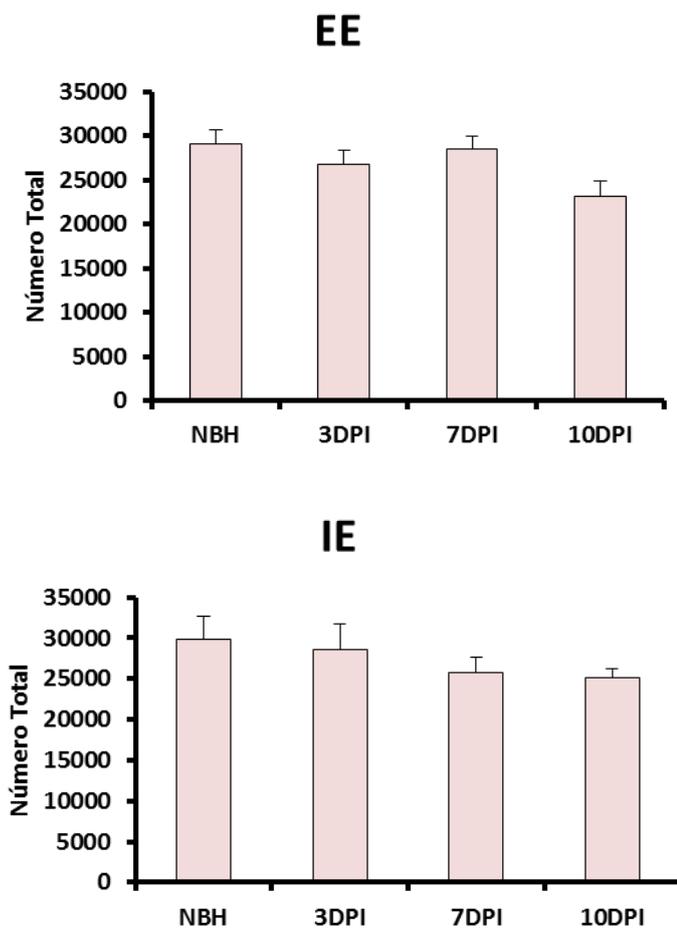
Outro parâmetro analisado foi a primeira escolha feita pelo animal, ou seja, ao ser colocado no centro do aparato do teste, verificou-se se o animal optou primeiramente pela palha familiar ou pela palha nova. De acordo com o grupo NBH, escolheu-se como linha de corte o valor de 60%, mostrando que o comportamento natural do grupo é escolher primeiramente pelo ambiente contendo a palha familiar. Os resultados revelaram que o grupo IE a partir do sexto dia mostrou uma alteração comportamental com uma escolha aleatória entre os dois odores e que se manteve pelo menos até o nono dia, enquanto que o grupo EE mostrou déficit semelhante apenas no sexto dia, recuperando-se em seguida (Figura 19).



**Figura 19-** Primeira escolha do animal ao ser colocado no centro do aparato do teste de discriminação olfatória. Resultados em porcentagem mostrando o comportamento de cada grupo nas janelas estudadas.

### 4.3 RESULTADOS ESTEREOLÓGICOS

Os dados quantitativos mostraram que não houve diferença entre os grupos analisados tanto no número total (figura 20) quanto no número de micróglias por camada na região de CA3 para o teste ANOVA um critério. No entanto, constatou-se uma tendência de redução do número de células na última janela no grupo EEPY, que foi confirmada pelo Teste T e pelo ANOVA dois critérios. Como aos 10dpi somente quatro animais foram quantificados é provável que essa redução não tenha sido encontrada no ANOVA um critério devido ao baixo número de animais, que será ampliado posteriormente. Os quadros abaixo mostram os resultados de cada grupo em cada janela com média, coeficiente de erro (CE) e coeficiente de variação biológica (CVB), que é calculado a partir da média, CE e desvio padrão de cada grupo.



**Figura 20-** Dados estereológicos da estimativa do número de micróglia totais em CA3 nos grupos controles e infectados nas janelas temporais estudadas.

Animais	Espessura da secção	N	CE	Animais	Espessura da secção	N	CE
<b>IENBH (Média)</b>	20,75±0,93	7996	0,05	<b>EENBH (Média)</b>	19,68±0,21	7064	0,06
D.P.		959,0		D.P.		1512	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,014		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,046	
$CE^2$		0,004		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,245		$CE^2/CV^2$		0,085	
$CVB^2$		0,011		$CVB^2$		0,042	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		75		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		91	
<b>IEPY 3dpi (Média)</b>	19,41±0,18	7377	0,06	<b>EEPY 3dpi (Média)</b>	19,34±0,16	6440	0,06
D.P.		2540		D.P.		1001	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,119		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,024	
$CE^2$		0,004		$CE^2$		0,003	
$CE^2/CV^2$		0,032		$CE^2/CV^2$		0,136	
$CVB^2$		0,115		$CVB^2$		0,021	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		97		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		86	
<b>IEPY 7dpi (Média)</b>	20,26±0,17	5741	0,07	<b>EEPY 7dpi (Média)</b>	20,2±0,2	6267	0,06
D.P.		1111		D.P.		551,5	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,037		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,008	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,138		$CE^2/CV^2$		0,465	
$CVB^2$		0,032		$CVB^2$		0,004	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		86		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		54	
<b>IEPY 10dpi (Média)</b>	19,41±0,18	5801	0,07	<b>EEPY 10dpi (Média)</b>	19,49±0,16	5403	0,06
D.P.		759		D.P.		661	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,017		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,015	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,005	
$CE^2/CV^2$		0,266		$CE^2/CV^2$		0,305	
$CVB^2$		0,013		$CVB^2$		0,010	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		73		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		70	

**Quadro 4** – Estimativa estereológica de micróglia ativadas no *stratum oriens* de CA3 dos grupos IENBH, IEPY 3dpi, IEPY 7dpi, IEPY 10dpi, EENBH, EEPY 3dpi e EEPY 10dpi e coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE).  $CVB^2 = CV^2 - CE^2$  (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

Animais	Espessura da secção	N	CE	Animais	Espessura da secção	N	CE
<b>IENBH (Média)</b>	20,29±1,00	2694	0,05	<b>EENBH (Média)</b>	19,03±0,17	2971	0,05
D.P.		587		D.P.		492	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,047		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,027	
$CE^2$		0,002		$CE^2$		0,002	
$CE^2/CV^2$		0,051		$CE^2/CV^2$		0,082	
$CVB^2$		0,045		$CVB^2$		0,025	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		95		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		92	
<b>IEPY 3dpi (Média)</b>	18,61±0,11	2872	0,05	<b>EEPY 3dpi (Média)</b>	18,97±0,15	2835	0,05
D.P.		777		D.P.		273	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,073		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,009	
$CE^2$		0,003		$CE^2$		0,003	
$CE^2/CV^2$		0,037		$CE^2/CV^2$		0,289	
$CVB^2$		0,071		$CVB^2$		0,007	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		96		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		71	
<b>IEPY 7dpi (Média)</b>	19,65±0,16	2621	0,05	<b>EEPY 7dpi (Média)</b>	19,87±0,23	2982	0,05
D.P.		382,8		D.P.		844	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,021		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,080	
$CE^2$		0,003		$CE^2$		0,003	
$CE^2/CV^2$		0,127		$CE^2/CV^2$		0,034	
$CVB^2$		0,019		$CVB^2$		0,077	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		87		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		97	
<b>IEPY 10dpi (Média)</b>	19,33±0,17	2492	0,05	<b>EEPY 10dpi (Média)</b>	18,98±0,15	2371	0,05
D.P.		124,8		D.P.		705	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,00251		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,088	
$CE^2$		0,00303		$CE^2$		0,003	
$CE^2/CV^2$		1,20612		$CE^2/CV^2$		0,034	
$CVB^2$		-0,00052		$CVB^2$		0,085	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		-21		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		97	

**Quadro 5** – Estimativa estereológica de micróglia ativadas no *stratum pyramidale* de CA3 dos grupos IENBH, IEPY 3dpi, IEPY 7dpi, IEPY 10dpi, EENBH, EEPY 3dpi e EEPY 10dpi e coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE).  $CVB^2 = CV^2 - CE^2$  (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

Animais	Espessura da secção	N	CE	Animais	Espessura da secção	N	CE
<b>IENBH (Média)</b>	20,35±1,06	1838	0,05	<b>EENBH (Média)</b>	18,96±0,31	1629	0,05
D.P.		515		D.P.		197	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,078		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,015	
$CE^2$		0,003		$CE^2$		0,003	
$CE^2/CV^2$		0,039		$CE^2/CV^2$		0,207	
$CVB^2$		0,075		$CVB^2$		0,012	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		96		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		79	
<b>IEPY 3dpi (Média)</b>	18,55±0,14	1646	0,05	<b>EEPY 3dpi (Média)</b>	18,88±0,15	1568	0,06
D.P.		544		D.P.		267	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,109		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,029	
$CE^2$		0,003		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,025		$CE^2/CV^2$		0,130	
$CVB^2$		0,107		$CVB^2$		0,025	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		98		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		87	
<b>IEPY 7dpi (Média)</b>	19,49±0,32	1692	0,06	<b>EEPY 7dpi (Média)</b>	19,85±0,26	1838	0,05
D.P.		554		D.P.		264	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,107		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,021	
$CE^2$		0,004		$CE^2$		0,003	
$CE^2/CV^2$		0,034		$CE^2/CV^2$		0,146	
$CVB^2$		0,104		$CVB^2$		0,018	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		97		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		85	
<b>IEPY 10dpi (Média)</b>	19,10±0,17	1542	0,06	<b>EEPY 10dpi (Média)</b>	18,85±0,4	1431	0,06
D.P.		212		D.P.		477	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,019		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,111	
$CE^2$		0,004		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,190		$CE^2/CV^2$		0,038	
$CVB^2$		0,015		$CVB^2$		0,107	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		81		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		96	

**Quadro 6** – Estimativa estereológica de micróglia ativadas no *stratum lucidum* de CA3 dos grupos IENBH, IEPY 3dpi, IEPY 7dpi, IEPY 10dpi, EENBH, EEPY 3dpi e EEPY 10dpi e coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE).  $CVB^2 = CV^2 - CE^2$  (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

Animais	Espessura da secção	N	CE	Animais	Espessura da secção	N	CE
<b>IENBH (Média)</b>	20,47±1,07	5407	0,07	<b>EENBH (Média)</b>	19,04±0,29	5029	0,07
D.P.		1302		D.P.		943	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,058		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,035	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,005	
$CE^2/CV^2$		0,089		$CE^2/CV^2$		0,130	
$CVB^2$		0,053		$CVB^2$		0,031	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		91		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		87	
<b>IEPY 3dpi (Média)</b>	18,7±0,16	5347	0,07	<b>EEPY 3dpi (Média)</b>	18,83±0,16	4635	0,07
D.P.		1131		D.P.		990	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,045		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,046	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,005	
$CE^2/CV^2$		0,122		$CE^2/CV^2$		0,114	
$CVB^2$		0,039		$CVB^2$		0,040	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		88		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		89	
<b>IEPY 7dpi (Média)</b>	19,54±0,19	4437	0,08	<b>EEPY 7dpi (Média)</b>	19,94±0,23	4713	0,07
D.P.		896		D.P.		400	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,041		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,007	
$CE^2$		0,006		$CE^2$		0,006	
$CE^2/CV^2$		0,142		$CE^2/CV^2$		0,781	
$CVB^2$		0,035		$CVB^2$		0,002	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		86		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		22	
<b>IEPY 10dpi (Média)</b>	19,09±0,16	4476	0,07	<b>EEPY 10dpi (Média)</b>	18,8±0,19	4260	0,07
D.P.		827		D.P.		477	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,034		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,013	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,006	
$CE^2/CV^2$		0,144		$CE^2/CV^2$		0,448	
$CVB^2$		0,029		$CVB^2$		0,007	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		86		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		55	

**Quadro 7** – Estimativa estereológica de micróglia ativadas no *stratum radiatum* de CA3 dos grupos IENBH, IEPY 3dpi, IEPY 7dpi, IEPY 10dpi, EENBH, EEPY 3dpi e EEPY 10dpi e coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE).  $CVB^2 = CV^2 - CE^2$  (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

Animais	Espessura da secção	N	CE	Animais	Espessura da secção	N	CE
<b>IENBH (Média)</b>	20,52±0,99	2840	0,07	<b>EENBH (Média)</b>	19,39±0,29	2960	0,06
D.P.		630		D.P.		293	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,049		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,010	
$CE^2$		0,004		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,092		$CE^2/CV^2$		0,399	
$CVB^2$		0,045		$CVB^2$		0,006	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		91		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		60	
<b>IEPY 3dpi (Média)</b>	19,01±0,16	3178	0,07	<b>EEPY 3dpi (Média)</b>	19,13±0,19	2598	0,06
D.P.		776		D.P.		356	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,060		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,019	
$CE^2$		0,004		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,073		$CE^2/CV^2$		0,218	
$CVB^2$		0,055		$CVB^2$		0,015	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		93		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		78	
<b>IEPY 7dpi (Média)</b>	19,80±0,16	2558	0,07	<b>EEPY 7dpi (Média)</b>	20,21±0,15	2961	0,06
D.P.		395		D.P.		307	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,024		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,011	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,206		$CE^2/CV^2$		0,392	
$CVB^2$		0,019		$CVB^2$		0,007	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		79		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		61	
<b>IEPY 10dpi (Média)</b>	19,19±0,15	2557	0,07	<b>EEPY 10dpi (Média)</b>	18,87±0,19	2064	0,06
D.P.		442		D.P.		406	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,030		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,039	
$CE^2$		0,005		$CE^2$		0,004	
$CE^2/CV^2$		0,153		$CE^2/CV^2$		0,109	
$CVB^2$		0,025		$CVB^2$		0,034	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		85		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		89	

**Quadro 8** – Estimativa estereológica de micróglia ativadas no *stratum lacunosum-moleculare* de CA3 dos grupos IENBH, IEPY 3dpi, IEPY 7dpi, IEPY 10dpi, EENBH, EEPY 3dpi e EEPY 10dpi e coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE).  $CVB^2 = CV^2 - CE^2$  (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

Animais	Espessura da secção	N	CE	Animais	Espessura da secção	N	CE
<b>IENBH (Média)</b>	20,16±0,19	32433,25	0,03	<b>EENBH (Média)</b>	19,41±0,17	29102	0,03
D.P.		6420		D.P.		3038	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,039182		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,011	
$CE^2$		0,001024		$CE^2$		0,001	
$CE^2/CV^2$		0,026134		$CE^2/CV^2$		0,097	
$CVB^2$		0,038158		$CVB^2$		0,010	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		97,38657		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		90	
<b>IEPY 3dpi (Média)</b>	19,31±0,17	29775	0,03	<b>EEPY 3dpi (Média)</b>	19,24±0,23	26820	0,03
D.P.		7934		D.P.		3470	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,071		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,017	
$CE^2$		0,001		$CE^2$		0,001	
$CE^2/CV^2$		0,016		$CE^2/CV^2$		0,042	
$CVB^2$		0,070		$CVB^2$		0,016	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		98		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		96	
<b>IEPY 7dpi (Média)</b>	19,22±0,24	25728	0,03	<b>EEPY 7dpi (Média)</b>	20,19±0,18	28489	0,03
D.P.		4200		D.P.		2958	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,027		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,011	
$CE^2$		0,001		$CE^2$		0,001	
$CE^2/CV^2$		0,037		$CE^2/CV^2$		0,098	
$CVB^2$		0,026		$CVB^2$		0,010	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		70		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		90	
<b>IEPY 10dpi (Média)</b>	19,41±0,31	25105	0,03	<b>EEPY 10dpi (Média)</b>	19,87±0,19	24346	0,03
D.P.		2346		D.P.		3566	
$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,009		$CV^2=(D.P./Média)^2$		0,024	
$CE^2$		0,001		$CE^2$		0,001	
$CE^2/CV^2$		0,103		$CE^2/CV^2$		0,044	
$CVB^2$		0,008		$CVB^2$		0,023	
$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		90		$CVB^2$ (% of $CV^2$ )		96	

**Quadro 9** – Estimativa estereológica do número total de micróglia ativadas em CA3 dos grupos IENBH, IEPY 3dpi, IEPY 7dpi, IEPY 10dpi, EENBH, EEPY 3dpi e EEPY 10dpi e coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE).  $CVB^2 = CV^2 - CE^2$  (CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho camundongos fêmeas da variedade Suíça albina foram acondicionados durante seis meses, em condições empobrecidas (IE) ou em condições enriquecidas (EE). Em seguida, os animais foram infectados pelo arbovírus Piry e durante a fase aguda da encefalite analisou-se quantitativamente o comportamento doentio e as alterações inflamatórias pela estimativa do número de células microgliais em cada camada de CA3, através do método do fracionador óptico, em três janelas temporais: 3, 7 e 10 dias após a inoculação.

A imunomarcagem para o vírus Piry demonstrou que seu tropismo inclui neurônios e células com morfologia típica de micróglia e de astrócitos, e a neuroinvasão viral inclui estruturas da via olfatória, região septal, CA3 ventral e camada polimórfica do giro denteado ventral. Embora o vírus produza encefalite em todos os animais adultos independente do ambiente, mudanças comportamentais e neuropatológicas foram significativamente mais evidentes nos animais que viveram em ambiente empobrecido. Além disso, o fenótipo morfológico pro-inflamatório microglial acompanhou as áreas de neuroinvasão e a intensidade da resposta inflamatória microglial foi maior e mais generalizada no parênquima cerebral dos animais do grupo IEPY em relação ao EEPY. Os grupos infectados exibiram um fenótipo microglial mais agressivo já na primeira janela temporal analisada (3 dpi), e essa alteração morfológica se tornou mais intensa aos 7 dpi, com fenótipo ameboide e ramos curtos e espessos, característico de estado ativado. Já nos grupos controles, a micróglia exibiu ramos longos, finos e corpo alongado, compatível com o fenótipo quiescente. No décimo dia após a inoculação, os animais do grupo IEPY ainda apresentaram a micróglia bem ativada, enquanto que no grupo EEPY as alterações morfológicas já haviam em grande extensão desaparecido.

As alterações comportamentais foram mais evidentes nos animais do grupo IEPY com a queda na atividade de burrowing desde os 2 dpi; redução do número de linhas cruzadas desde os 7 dpi; aumento do tempo imóvel desde os 3 dpi; e perda da discriminação olfatória aos 9dpi. Já no grupo EEPY o burrowing permaneceu inalterado; as principais alterações no campo aberto foram observadas aos 7dpi; e não houve perda da capacidade discriminativa em nenhuma janela analisada. Em relação à estimativa do número de micróglia em CA3, não houve alteração no número de micróglia em nenhuma janela temporal tanto na estimativa total da região quanto na estimativa em cada uma das camadas, indicando que a encefalite

provocou uma alteração morfológica dessas células, mas sem alterar o seu número ao longo do curso temporal da encefalite aguda.

### *Neuroinvasão viral*

Uma variedade de vírus neurotrópicos podem usar o sistema olfatório como rota para a neuroinvasão de cérebros de mamíferos como o vírus herpes simples 1 (ESIRI; TOMLINSON, 1984), vírus da hepatite murina (BARNETT; PERLMAN, 1993), vírus da pseudo-raiva (BABIC et al., 1994), vírus da encefalite equina venezuelana (CHARLES et al., 1995) e o vírus da raiva CVS (LAFAY et al., 1991). Após a inoculação intranasal do vírus da encefalite equina venezuelana, observou-se primeiramente a invasão do sistema olfatório, seguida da invasão dos núcleos trigeminais mais tardiamente. Além disso, a ablação da rota olfatória preveniu a invasão por essa via, mas não interferiu na entrada do vírus pela rota trigeminal, que foi suficiente para induzir encefalite letal (CHARLES et al., 1995).

Muitas evidências sugerem a via olfatória como a principal via de entrada no SNC. Isso se deve primeiramente à arquitetura do neuroepitélio olfatório, no qual os neurônios sensoriais primários são desprotegidos pela barreira hematoencefálica, devido à presença de capilares fenestrados, o que favorece o acesso do patógeno aos neurônios não mielinizados. Dessa forma, esses neurônios projetam para o glomérulo olfatório e para as áreas de projeção do córtex olfatório primário (CHARLES et al., 1995).

Um trabalho recente utilizou partículas virais do vírus da encefalite equina venezuelana para modular os eventos iniciais da neuroinvasão, mostrando que a replicação dessas partículas virais na mucosa nasal provocou a ruptura da barreira hematoencefálica, facilitando a infecção viral. Por outro lado, a inibição da abertura dessa barreira dificultou a neuroinvasão e a patogênese, sugerindo que esse vírus entra pela via olfatória, onde se replica, induz a ruptura da barreira e provoca uma segunda onda de invasão da periferia para o SNC (SCHAFER et al., 2011).

A sequência da neuroinvasão para o arbovírus Pirý observada neste trabalho corrobora os achados de trabalhos anteriores para o camundongo C57BL6 (LINS; PASSOS, 2008) e para a variedade albina suíça em neonatos (SANTOS; BRAGA, 2008; SOUSA et al., 2011). Essa rota de neuroinvasão lembra aquela do VSV (LUNDH, B.; KRISTENSSON, K.; NORRBY, 1987, HUNEYCUTT et al., 1993) e a de outros dois rabdovírus: Curionópolis e

Itacaiúnas (DINIZ et al., 2006), iniciando-se no bulbo olfatório em direção às áreas corticais e subcorticais de projeção da via olfatória, assim como a amígdala e o hipocampo.

### *Neuropatologia e estereologia*

Estudo recente quantificou a resposta inflamatória em camundongos C57BL6 na fase aguda da infecção, mostrando que a resposta inflamatória no grupo infectado foi cerca de 4 vezes maior que no grupo controle (LINS; PASSOS, 2008). Da mesma forma, a resposta inflamatória e a perda de matriz extracelular foi maior nos animais que viveram em ambiente empobrecido em relação aos animais que receberam estímulo ambiental em camundongos suíço albinos infectados pelo vírus Piry (SOUSA et al., 2011).

A morte neuronal provocada pelo vírus da encefalite japonesa é acompanhada por astrocitose e microgliose, com proliferação celular, alterações morfológicas e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , particularmente pela micróglia ativada (CHEN et al., 2010). Associado a isso, sabe-se também que a infecção causada pelo VSV, que possui uma neuroinvasão muito semelhante a do arbovírus Piry, provoca infecção aguda no SNC com proliferação microglial e astrocítica associada ao aumento da expressão da enzima sintase do óxido nítrico e recrutamento de linfócitos T na fase aguda da infecção (BI et al., 1995).

Por outro lado, este trabalho utilizou um método de quantificação estereológica através do qual não foi detectada alteração no número de células microgliais nas camadas de CA3 no teste ANOVA um critério. No entanto, encontrou-se uma redução significativa no número total na última janela nos animais do grupo EEPY nos testes T e ANOVA dois critérios. Essa redução, caso seja confirmada pelo aumento do número de animais analisados, pode ser explicada pelo clearance viral que ocorre nos animais desse grupo. Essa divergência em relação aos outros estudos pode ser justificada principalmente pelo emprego de marcadores microgliais diferentes, pela titulação viral e pela diferença na resposta imune das linhagens de camundongos utilizadas. Atualmente, o marcador provavelmente mais versátil existente no mercado para marcação de micróglia é o Iba1, uma proteína adaptadora ligante do canal de cálcio. Embora não se tenha constatado um aumento no número de micróglia, a ativação microglial acompanhou a neuroinvasão provocada pelo Piry mostrando-se presente ao longo da via olfatória, região septal, CA3 ventral e camada polimórfica do giro denteado ventral, estando relacionada com as alterações comportamentais descritas abaixo.

### *Alteração comportamental e ambiente enriquecido*

Estudos prévios mostraram que condições enriquecidas de alojamento atenuaram a resposta inflamatória após infarto encefálico (RUSCHER et al., 2009), reduziram as desigualdades na astrogliose reativa entre os lados contra e ipsilateral no modelo de inflamação crônica da dor em ratos (GABRIEL et al., 2009), induziram astrogliogênese para preservar o sistema nigroestriatal contra toxicidade induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (ANASTASIA et al., 2009), e diminuíram a resposta inflamatória e alterações comportamentais de camundongos infectados pelo arbovírus Piry (SOUSA et al., 2011). Dessa forma, este trabalho teve como propósito correlacionar características neuropatológicas quantitativas de encefalite viral com enriquecimento ambiental e mudanças comportamentais na fase aguda da infecção.

A alteração no burrowing iniciou no segundo dia após inoculação nos animais do grupo IEPY e permaneceu até a última janela analisada (10 dpi) neste grupo, já os animais do grupo EEPY não apresentaram alterações significantes em relação ao grupo controle. Sousa e colaboradores (2011) mostraram que a atividade do burrowing caiu no sexto dia pi no grupo infectado empobrecido, já neste trabalho utilizamos uma janela mais recente que mostrou que este teste parece ser o teste mais sensível à infecção viral e que afetou apenas o grupo IEPY. Uma vez que danos na região septal têm consequências similares às lesões em ambos os hipocampus ventral e dorsal (BANNERMAN et al., 2004b) e que a atividade do burrowing é relacionada a danos seletivos no hipocampo dorsal (DEACON et al., 2001, DEACON; RAWLINS, 2005, GASKIN et al., 2009), é provável que a queda da atividade do burrowing esteja associada ao dano encontrado na região septal nos animais infectados (BANNERMAN et al., 2004a).

Tendo em vista que a marcação de antígenos virais foi mais intensa nos animais do grupo IEPY e que a alteração morfológica das células gliais foi também mais evidente nesse grupo, e que o enriquecimento ambiental tem sido associado à liberação de fatores neurotróficos é razoável propor que esses fatores possam ter sido liberados nos animais do ambiente enriquecido e que isso tenha contribuído pelo menos em parte para redução da resposta inflamatória induzida pelo vírus. Essa neuroproteção talvez esteja associada à liberação de IL-6 capaz de estimular a produção de receptores de IL-6 e de inibidores de citocinas como IL-1ra, IL-10, durante o exercício regular (PEDERSEN, 2009) componente esse representado pelo exercício voluntário nas rodinhas de correr sempre presentes na

composição do ambiente enriquecido. Outros estudos mostraram que o exercício moderado reduz a mortalidade provocada pelo vírus influenza tanto em camundongos (LOWDER; PADGETT; WOODS, 2005) quanto em humanos (WONG et al., 2008).

A medida da atividade exploratória e do comportamento ansioso pelo teste de campo aberto mostrou aumento do tempo imóvel e redução do número de linhas cruzadas no grupo EEPY, principalmente aos 7 dpi, enquanto que no grupo GPPY essa alteração permaneceu até o décimo dia. Ratos com lesão citotóxica no hipocampo ventral (BANNERMAN et al., 2003) e camundongos inoculados por via intracerebral com o sorotipo III genotipo I do vírus da dengue (de MIRANDA et al., 2012) não apresentaram alterações na atividade motora no campo aberto. No entanto, outros estudos têm mostrado que lesões no hipocampo ventral aumentam a atividade exploratória, devido ao comprometimento do circuito envolvido com questões emocionais como medo e ansiedade (GOOD; HONEY, 1997, BANNERMAN et al., 1999). Porém, a relação entre medo/ansiedade e atividade exploratória é bem mais complexa, sugerindo que essa atividade está relacionada ao medo quando o animal é colocado pela primeira vez no aparato, mas que em situações subsequentes essa reação de medo é reduzida devido à habituação ao aparato (GRAY, 1982). Dessa forma, verificou-se que os animais do grupo EEPY retornaram ao padrão de exploração verificado no grupo NBH, enquanto que os animais do grupo IEPY continuaram apresentando um aumento do tempo imóvel até o décimo dia e essa alteração permaneceu até os 20 d.p.i., como mostrado por SOUSA e colaboradores (2011). Vale lembrar que uma vez que os animais do grupo EEPY também sofreram alteração na atividade exploratória, conclui-se que a redução na atividade de burrowing está relacionada à lesão septal e/ou hipocampal e não a uma alteração motora.

No teste de discriminação olfatória somente o grupo IEPY foi afetado, com perda significativa da capacidade discriminativa na última janela temporal. A perda da capacidade discriminativa observada neste trabalho parece estar relacionada à lesão das vias olfatórias claramente tomadas pela resposta inflamatória mais intensa. Isso pode ser justificado pelo fato de que o córtex piriforme, a amígdala e o entorrinal parecem ser os substratos responsáveis pelo reconhecimento olfatório. Embora a contribuição do piriforme e da amígdala não esteja bem esclarecida, lesões no entorrinal eliminam a capacidade de hamsters fêmeas discriminarem entre odores de machos aos quais foram previamente expostas. Essa perda não está relacionada à rupturas das projeções para o hipocampo via fórnix, pois animais que tiveram lesões hipocámpais não perderam a capacidade de discernir odores de outros

animais (PETRULIS; PENG; JOHNSTON, 2000). Entretanto o reconhecimento de familiaridade depende da integridade do córtex entorrinal e este pode ter sido afetado pelos níveis de citocinas elevados associados à resposta inflamatória microglial.

A ausência de discriminação entre os odores das palhas usadas nos testes parece ocorrer devido a: 1) insuficiência olfativa provocada pelo comprometimento das áreas de baixa hierarquia e não a uma falta de discriminação complexa associada à memória. 2) Comprometimento da capacidade de reconhecer um odor familiar por lesão do córtex entorrinal; 3) Combinação das duas possibilidades em graus variados.

Poucos estudos avaliaram a capacidade discriminativa em camundongos após encefalite viral, o que dificulta a comparação com outros trabalhos. No entanto, sabe-se que camundongos infectados com o vírus da hepatite murina (JHM) perderam a capacidade de discriminar a presença de um odor no teste 'go, no-go'; e a anatomia patológica das lesões mostrou que esse vírus destrói o epitélio olfatório, bulbo olfatório, córtex piriforme e gânglio trigeminal com maior impacto no sexto dia após a inoculação (YOUNGENTOB, 2001).

Esse trabalho, no entanto, não mostrou alteração olfatória no pico da encefalite viral (7 dpi). Isso poderia ser explicado pela preservação de pequena população de neurônios sensoriais capazes de realizar a detecção (YOUNGENTOB, 1997; HARDING, 1978). O fato dessa alteração aparecer mais tardiamente pode ser explicada pelo aumento tardio da resposta inflamatória que permanece presente 10 dias após a infecção nos animais do grupo IEPY mas não no EEPY. É possível que a indução de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção aguda, como o TNF- $\alpha$ , possa afetar a regeneração que normalmente resulta na rápida substituição dos neurônios olfatórios sensoriais perdidos nesse processo infeccioso, mas também é possível que níveis de citocinas elevados comprometam o desempenho da memória olfatória. No entanto, são necessários novos estudos que elucidem os aspectos moleculares dessa perda associada ao processo inflamatório agudo.

### *Limitações Técnicas dos Ensaios Neuropatológicos Quantitativos*

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; GUNDERSENS, 2001). No presente trabalho elegemos esse procedimento adotando zona de guarda para evitar o problema do dano tecidual na superfície de corte, onde perda provável de objetos de interesse é frequente se a contagem é realizada sem o estabelecimento da zona de guarda (ANDERSEN; 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 (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.

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

Um dos alvos do presente trabalho foi estimar o número de células alteradas dentro de um determinado volume de tecido em CA3, usando investigação estereológica sem vies. Como em todos os casos onde se utiliza a microscopia para realizar tais estimativas, não é possível contar todas as células dentro da região de interesse. Para contornar esse dilema de obter estimativas confiáveis (que se aproximam do real) a partir de uma diminuta fração amostral, é necessário a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a

terceira dimensão. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (SCHMITZ & HOF, 2005). Entretanto, com esse procedimento, o máximo que se pode pretender é realizar estimativas que se aproximem ao máximo do que seria esperado (CRUZ-ORIVE, 1994, SCHMITZ, 1998). No presente trabalho uma das dificuldades difíceis de contornar é o fato de que em secções tangenciais os limites entre as áreas e sua laminação obriga o experimentador a não incluir tais secções. No presente trabalho onde se empregou cortes parasagittais, as secções laterais mais extremas são tangenciais tendo sido excluídas da contagem. Dessa forma é possível que os números estimados representem subestimativas. De qualquer modo, como os dois grupos experimentais foram cortados do mesmo modo e o número de secções excluídas são equivalentes em ambos, é razoável supor que as subestimativas não explicam os resultados encontrados.

Além disso avaliou-se previamente várias maneiras de se estimar o erro em amostras simuladas por computador de modo a encontrar um modo de calcular o coeficiente de erro que mais se aproximasse do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (GLASER & WILSON, 1998). Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total ( $CE^2/CV^2 < 0,5$ ), onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e  $CV = (\text{Desvio Padrão}/\text{Média})$ . No presente trabalho a relação  $CE^2/CV^2$  na maioria dos casos esteve sempre abaixo de 0,5, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens. Quando se encontrou exceções a essa regra ficou patente que ela não se aplicava em função do fato de que o coeficiente de variação e o coeficiente de erro eram muito pequenos perdendo o sentido de se aplicar a regra geral (SLOMIANKA & WEST, 2005).

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

para o coeficiente global de variação. Em geral a relação previamente descrita  $CE2/CV2 < 0,05$  acompanha esse parâmetro havendo igualmente exceções que confirmam a regra.

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, contracoloração, etc.) sendo coletados e analisados utilizando o mesmo método estereológico e mesmo programa. Para detectar possíveis variações nos critérios para identificar os objetos e áreas de interesse procedimentos de verificação dos resultados, foi realizada a contagem eventual da mesma região por investigadores diferentes. Finalmente é preciso considerar o fato de que a plasticidade microglial pode ser afetada por corticoesteróides que inibem a ativação microglial (SUGAMA et al., 2009). No presente trabalho, poderia ser arguido que a manipulação durante os testes comportamentais pode ter alterado os níveis plasmáticos de corticoesteróides e assim diminuir a ativação microglial. Não se fez medidas plasmáticas de corticoesteróides, e, portanto, não se pode excluir completamente a possibilidade de que diferentes níveis de corticoesteróides possam explicar os resultados. Entretanto, os testes comportamentais foram aplicados igualmente a todos os sujeitos de ambos os grupos experimentais podendo ser excluída a possibilidade do estresse de manipulação poder explicar as diferenças encontradas. Como resultado, as possíveis variações associadas às fontes não-biológicas foram reduzidas para níveis aceitáveis no presente trabalho (MOUTON et al. 2002, SLOMIANKA & WEST, 2005).

## 6. CONCLUSÕES

Nossos estudos confirmam e expandem resultados anteriores que a instilação nasal de homogenado de cérebro infectado pelo arbovírus Piry em camundongos adultos albinos Suíços induz (i) encefalite aguda com neuroinvasão das vias olfativas, região septal e hipocampo ventral, (ii) a infecção leva a um aumento do número de micróglias com perfil pró-inflamatório sem afetar o número total, (iii) a infecção pelo vírus Piry altera a morfologia da micróglia em grau mais elevado em 7dpi, depois dos sinais clínicos já terem se manifestado, (iv) o enriquecimento ambiental está associado à mudanças comportamentais menos intensas, menor grau de ativação das micróglias e recuperação mais rápida dos níveis anormais desses elementos em comparação aos animais do ambiente empobrecido que, além de alterações em tarefas hipocampo-dependentes, apresentam déficits olfatórios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASIA, A. et al. Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v.109, p.755-765, 2009.

ANDERSEN, B. B.; GUNDERSEN, H. J. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. **J Microsc**, v. 196 (Pt 1), p. 69-73.

ARAÚJO, R. et al. Miocardite experimental em camundongos albinos por vírus Piry (BeAn 24232). **Rev Inst Med trop São Paulo**, v.20, p.102-111, Mar.1978.

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.

BANNERMAN, D.M. et al. Medial septal lesions mimic effects of both selective dorsal and ventral hippocampal lesions. **Behav Neurosci**, v.118, p.1033-1041, 2004a.

BANNERMAN, D.M. et al. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v.28, p.273-283, 2004b.

BANNERMAN, D. M.; GOOD, M. A. et al. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behavioural Neuroscience** 113 (6), p. 1170-1188, 1999.

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, 1993.

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.

BORNER, R., et al. Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: Stereological analysis in the albino Swiss mice model. **Prion**, v.5, 2011.

BROWN, T. H.; ZADOR, A. M. Hippocampus. In: SHEPHERD, G. M. **The synaptic organization of the brain**. 3.ed. New York: OxfordUniversity Press, 1990. p. 346-388.

CARR, W. J.; YEE, L.; GABLE, D. et al. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **Journal of comparative and Physiological Psychology**. v. 9. p. 821-828. 1976.

CHARLES, P. C.; WALTERS, E. et al. Mechanism of neuroinvasion of venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. **Virology** 208, p. 662-671, 1995.

CHAUHAN, V.S.;FURR, S. R. et al. Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses.**Virology** 400(2): 187-196, 2010.

CHOI, Y.S. IGF-1 Receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. **Glia**, v.56, p.791-800, May.2008.

CHRISTIAN, A. Y., BARNA, M. 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.

C-J CHEN; Y-C OU et al. Glial activation involvement in neuronal death by Japanese encephalitis virus infection. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 1028–1037, 2010.

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.

CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiology of Aging**, v. 15 (3), p. 377-378.

CUNNINGHAM, C. Mouse Behavioural Studies and What They Can Teach Us about Prion Diseases. **Neurodegeneration and Prion Disease**, p.111-137, 2005.

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

DEACON, R.M.J. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nat Protoc**, v.1, p.118-121, 2006.

DEACON, R.M.J. Burrowing: A sensitive behavioral assay, tested in five species of laboratory rodents. **Behav Brain Res**, v.200, p.128-133, Jun.2009.

DEACON, R.M. et al. Burrowing into prion disease. **Neuroreport**, v.12, p.2053-2057, Jul.2001

DEACON, R.M.; RAWLINS, J.N. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. **Behav Brain Res**, v.156, p.241-249, 2005.

De MIRANDA, A. S.; RODRIGUES, D. H. et al. Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research** 230, p. 237– 242, 2012.

DESHMUKH, S.S.; BHALLA, U.S. Representation of odor habituation and timing in the hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 1903-1915, 2003.

DE SOUSA, A. A.; REIS, R et al. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. **PLoS One** 6(1): 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, Dec.2006.

DORPH-PETERSEN, K. A.; NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. G. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. **J Microsc.**, v. 204 (Pt 3), p. 232-246.

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, 1984.

FALOUGY, E.; BENUSKA, J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. **BratisLekListy**, v.107, p.103-106, 2006.

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

FIGUEIREDO, L.T.M., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., FIORILLO, A.M. Níveis de anticorpos para arbovírus da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, v.20, p.204-211, 1986.

FRANKLIN, S.L. et al. Loss perineuronal nets in ME7 prion disease. **JNeuropatholExpNeurol**, v.67, p.189-199, Mar.2008.

GABRIEL, A.F. et al. Environmental housing affects the duration of mechanical allodynia and the spinal astroglial activation in a rat model of chronic inflammatory pain. **Brain Res**, v.1276, p.83-90, 2009.

GARDELLA, D. et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical dissector counting vibratome-, plastic- and cryosections. **J Neurosci Methods**, v. 124 (1), p. 45-59.

GARDEN, G.A.; MOLLER, T. Microglia biology in health and disease. **J NeuroimmunePharmacol**, v.1, p.127-137, Jun.2006.

GASKIN, S. et al. Incidental (unreinforced) and reinforced spatial learning in rats with ventral and dorsal lesions of the hippocampus. **Behav Brain Res**, v.202, p.64-70, 2009.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionators population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **J Microsc.**, v. 192 (Pt 2), p. 163-71.

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J. Microglia: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119(1), p.89-105, 2010.

GOMES-LEAL, W., MARTINS, L. C. et al. (2006). Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice. **Acta Tropica** 97(2): 126-139, 2006.

GOOD, M.; HONEY, R. C. Dissociable effects of selective lesions to hippocampal subsystems on exploratory behavior, contextual and spatial learning. **Behavioural Neuroscience** 111 (3), p. 487-493, 1997.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res** 33(4): 330-342, 2002.

GUBLER, D. J.; Meltzer, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv Virus Res** 53: 35-70, 1999.

HABETS, A.M.M.C.; DA SILVA, F.H.L.; MOLLEVANGER, W.J. An olfactory input to the hippocampus of the cat: field potential analysis. **Brain Res**, v. 182, p. 47-64, 1980.

HARDING, J. W.; GETCHELL, T. V.; MARGOLIS, F. L. Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long-term effect of intranasal ZnSO<sub>4</sub> irrigation on behavior, biochemistry and morphology. **Brain Res.**, v. 140 (2), p. 271-285, 1978.

HILBIG, H. et al. Enriched environmental conditions reverse age-dependent gliosis and losses of neurofilaments and extracellular matrix components but do not alter lipofuscin accumulation in the hindlimb area of the aging rat brain. **J Chem Neuroanat**, v.23, p.199-209, Mar. 2002.

HILLMAN, C.H.; ERICKSON, K.I.; KRAMER, A.F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v.9, p.58-65, Jan.2008.

HUNEYCUTT, B.S. et al. Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. **J Virol**, v.67, p.6698-6706, Nov.1993.

INSAUSTI, R.; AMARAL, D.G. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G.; MAI, J.K. **The human nervous system**. 2.ed. Elsevier, 2004.

IWASAKI, T., ITAMURA, S. 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.; HAUSER, S. L. Neurological disease on the global agenda. **Ann Neurol** 64(1): A11-12, 2008.

KARABATSOS, N., ed. **International Catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates**. 3. ed. San Antonio, ASTMH, 1985.

KESNER, R.P.; GILBERT, P.E.; BARUA, L.A. The role of the hippocampus for the temporal orders of a sequence of odors. **Behavioral Neuroscience**, v. 116, p.286-290, 2002.

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

LADEBY, R. et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. **Brain Res Brain Res Rev**, v.48, p.196-206, Apr.2005.

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, 1991.

LEINWAND, S.G.; CHALASANI, S.H. Olfactory networks: from sensation to perception. **Curr Opin Genet Dev**, v. 21, p. 1-6, 2011.

LINS, N.; PASSOS, A. **Astrocitose e microgliose na doença neurodegenerativa crônica agravada por infecção pelo arbovírus piry**. 53.f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

LOWDER, T.; PADGETT, D.A.; WOODS, J.A. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. **Brain Behav Immun**, v.19, p.377-380, Sep.2005.

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, 1987.

LYNCH, M.A. The multifaceted profile of activated microglia. **Mol Neurobiol**, v.40, p.139-156, Oct.2009.

MARIANI, M.M.; KIELIAN, T. Microglia in infectious diseases of the central nervous system. **J Neuroimmune Pharmacol**, Sep.2009.

MOTT, A.E.; LEOPOLD, D.A. Disorders in taste and smell. **Med Clin North Am**, v. 75 (6), p. 1321-53.

MOUTON, P. R. et al. Stereological length estimation using spherical probes. **J Microsc.**, v. 206 (Pt 1), p. 54-64, 2002.

NAKASHIBA, T. et al. Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. **Neuron**, v. 62, p. 781-787, 2009.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p.697-709, Sep.2006.

PARACHIKOVA, A.; NICHOL, K.E.; COTMAN, C.W. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. **Neurobiol Dis**, v.30, p.121-129, Apr.2008.

PEDERSEN, B.K. Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. **J Appl Physiol**, v.107, p.1006-1014, 2009.

PETRULIS, A.; PENG, M.; JOHNSTON, R. E. Role of hippocampal system in social odor discrimination and scent-marking in female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Behavioural Neuroscience** 114 (1), p. 184-195, 2000.

PINHEIRO, F.P. Piry Fever In: CRC handbook series in zoonosis. Viral zoonosis. Boca Raton: CRC Press, 1981, p.187-190.

POELLINGER, A. et al. Activation and habituation in olfaction-an f MRI study. **NeuroImage**, v. 13, p. 547-560, 2001.

REISS, C. S., PLAKHOV, I. V. et al. Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. **Ann N Y Acad Sci** 855: 751-761, 1998.

REMPEL, J. D.; MURRAY, S. J. et al. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. **Virology** 318: 381-392, 2004.

ROCK, R.B. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v.17, p.942-964, Oct.2004.

RUSCHER, K. et al. Enriched environment reduces apolipoprotein E (ApoE) in reactive astrocytes and attenuates inflammation of the peri-infarct tissue after experimental stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.29, p.1796-1805, 2009.

SANTOS, Z. A.; BRAGA, M. A. G. **Neotropismo e neuropatologia secundárias à infecção experimental por espécies virais selecionadas da família rhabdoviridae e cinética da infecção pelo arbovírus piry em modelo murino.** Centro de Ciências da Saúde. Belém, Universidade Federal do Pará. Graduação em Medicina: 60, 2008.

SAWADA, M.; SAWADA, H.; NAGATSU, T. Effects of aging neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. **Neurodegener Dis**, v.5, p.254-256, Mar.2008.

SCHAFER, A.; BROOKE, C. B. et al. Role of the blood-brain barrier during venezuelan equine encephalitis virus infection. **J Virol** 85 (20), p. 10682-10690, 2011.

SCHMITZ, C.; HOF, P.R. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v.130, p.813-831, 2005.

SLOMIANKA, L. WEST, M.J. 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.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioural Process**. v. 17, p. 181-190, 1988.

SUGAMA, S. et al. Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. **J Neuroimmunol**, v. 208(1-2), p. 104-114.

TAVARES-NETO, J. et al. Frequência de anticorpos neutralizantes contra o vesiculovírus Piry, em doadores de sangue de Uberaba, Minas Gerais, Brasil. **Ver Inst Med trop São Paulo**, v.32, p.211-214, Mai-Jun.1990.

TAVARES-NETO, J. et al. Comparação de dois testes de neutralização, utilizados no diagnóstico sorológico do vesiculovírus Piry. **Rev Saúde Pública**, v.27, p.373-377, 1993.

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial “activation” continuum: from innate to adaptive responses. **J Neuroinflammation**, v.31, p.1-10, Oct.2005.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; MATHER, T. N. 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.

TRIVEDI, M.A.; COOVER, G.D. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. **Neurobiol Learn Mem**, v.81, p.172-184, May.2004.

VAN DEN POL, A. N.; OZDUMAN, K. et al. Viral strategies for studying the brain, including a replication-restricted self-amplifying delta-G vesicular stomatitis virus that rapidly expresses transgenes in brain and can generate a multicolor golgi-like expression. **J Comp Neurol** 516(6): 456-481, 2009.

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

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

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, v.1, p.191-198, Dec.2000.

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 Saude Publica**, v.17, p.155-64, 2001.

VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, p.17-21, Jan. 2005.

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.G. 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.

WONG, C.M. et al. Is exercise protective against influenza-associated mortality? **PLoS One**, v.7, e2108, May.2008.

WU, C.W. et al. Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. **J Neurochem**, v.103, p.2471-2481, Dec.2007.

YOUNGENTOB, S. L.; SCHWOB, J. E. et al. Odorant threshold following methyl bromide-induced lesions of the olfactory epithelium. **Physiology & Behavior**, v. 62 (6), p. 1241-1252, 1997.

YOUNGENTOB, S. L.; SCHWOB, J. E. et al. Functional consequences following infection of the olfactory system by intranasal infusion of the olfactory bulb line variant (OBLV) of mouse hepatitis strain JHM. **Chem. Senses** 26, p. 953-963, 2001.

ZHANG, W.N. et al. Dissociation of function within the hippocampus: effects of dorsal, ventral and complete excitotoxic hippocampal lesions on spatial navigation. **Neuroscience**, v.127, p.289-300, 2004.

ZIELASEK, J.; HARTUNG, H.P. Molecular mechanisms of microglial activation. **Adv Neuroimmunol**, v.6, p.191-122, 1996.

**ANEXO – CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

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 / H.U.JBB/UFPA