

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

**ROSEANE BORNER DE OLIVEIRA**

**Neurodegeneração Crônica em Modelo Murino: Ensaio  
Comportamentais e Neuropatológicos na Doença PRION em  
Fêmeas Adultas de Camundongos Albinos Suíços**

**BELÉM-PA  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ROSEANE BORNER DE OLIVEIRA**

**Neurodegeneração Crônica em Modelo Murino: Ensaio  
Comportamentais e Neuropatológicos na Doença PRION em  
Fêmeas Adultas de Camundongos Albinos Suíços**

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

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz

**BELÉM-PA**

**2009**

**ROSEANE BORNER DE OLIVEIRA**

**Neurodegeneração Crônica em Modelo Murino: Ensaios Comportamentais e Neuropatológicos na Doença PRION em Fêmeas Adultas de Camundongos Albinos Suíços**

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

Data da aprovação:

Banca Examinadora:

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Consentino Kronka Sosthenes  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Rubem Carlos de Araújo Guedes  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

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

**Dedico este trabalho científico:**

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

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

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

## **AGRADECIMENTO**

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

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

A meus filhos pela compreensão de tantos momentos ausentes.

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

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE QUADROS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	15
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 EXPANSÃO DA POPULAÇÃO IDOSA NO BRASIL E NO MUNDO E O CUSTO SOCIAL DO ENVELHECIMENTO.....	19
1.2 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL EM CÉREBROS NORMAIS.....	22
1.3 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL ALTERADA PELA NEURODEGENERAÇÃO CRÔNICA EM MODELO MURINO DE DOENÇA PRION E NA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	28
1.4 ESTIMATIVAS NUMÉRICAS SEM VIÉS: UM CAPÍTULO RECENTE DA NEUROMORFOLOGIA QUANTITATIVA.....	41
1.4.1 <b>O fracionador óptico em ação.....</b>	<b>43</b>
1.4.2 <b>Identificação dos objetos e das áreas de interesse no cérebro normal e alterado: imunohistoquímicas, histoquímicas seletivas e injeção de traçadores.....</b>	<b>47</b>
1.5 O MODELO EXPERIMENTAL.....	52
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
3.1 ANIMAIS, ANESTESIA E INOCULAÇÃO DOS HOMOGENADOS CEREBRAIS.....	56
3.2 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	60
3.2.1 <b>Burrowing.....</b>	<b>60</b>
3.2.2 <b>Atividade de campo aberto.....</b>	<b>61</b>
3.2.3 <b>Pontes de bastão.....</b>	<b>61</b>
3.3 IDENTIFICAÇÃO INAMBÍGUA DAS ÁREAS E OBJETOS DE INTERESSE: ENSAIOS HODOLÓGICOS, ARQUITETÔNICOS HISTOQUÍMICA SELETIVA E IMUNOMARCAÇÃO.....	62
3.3.1 <b>Injeção e revelação do neurotraçador.....</b>	<b>62</b>
3.3.2 <b>Sacrifício, fixação e corte.....</b>	<b>64</b>
3.3.3 <b>Imunohistoquímica seletiva para neurônios.....</b>	<b>65</b>
3.3.4 <b>Imunohistoquímica para GFAP.....</b>	<b>67</b>
3.3.5 <b>Histoquímica para revelação da microglia ativada.....</b>	<b>68</b>

3.3.6	Histoquímica para detecção da rede perineuronal.....	70
3.3.7	Imunohistoquímica para PrP <sup>Sc</sup> .....	70
3.3.8	Contracoloração de Nissl.....	71
3.3.9	Avaliação quantitativa de neurônios, astrócitos, microglia e rede perineuronal.....	72
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4	<b>RESULTADOS</b> .....	76
4.1	CARACTERIZAÇÃO HODOLÓGICA E ARQUITETÔNICA DO HIPOCAMPO E DO GIRO DENTEADO E ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS DO GIRO DENTEADO.....	76
4.2	ACHADOS NEUROPATOLÓGICOS.....	83
4.2.1	Análise qualitativa.....	83
4.2.1.1	Análises qualitativas da microglia e astrócitos.....	83
4.2.1.2	Redes perineuronais.....	85
4.2.1.3	Terminais Axonias.....	87
4.2.1.4	Vacuolização e Depósitos Amilóides : PrP <sup>Sc</sup> e PrP <sup>C</sup> .....	88
4.2.2	Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico.....	89
4.2.2.1	Microglia Ativada .....	89
4.2.2.2	Rede Perineuronal.....	97
4.2.2.3	Astrócitos.....	102
4.2.2.4	Neurônios .....	114
4.3	ACHADOS COMPORTAMENTAIS NOS CAMUNDONGOS C57BL6J E ALBINO SUIÇO: REMOÇÃO E ESTOCAGEM DE COMIDA, ARENA ABERTA (OPEN FIELD) E PONTE DE BASTÕES .....	121
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	125
5.1	ANÁLISE COMPORTAMENTAL DA EVOLUÇÃO DA DOENÇA PRION NOS MODELOS MURINOS C57BL6J E ALBINO SUIÇO.....	125
5.1.1	Ensaio Comportamentais .....	125
5.1.2	Achados Neuropatológicos.....	129
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS E DOS OBJETOS DE INTERESSE PARA ESTIMATIVAS QUANTITATIVAS SEM VIÉS.....	135
5.3	CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS.....	137
5.3.1	Acerca do Neurotraçador.....	137
5.3.2	Acerca das Distorções no eixo Z em Secções Obtidas com Vibrátomo... ..	138
5.3.2	Os Limites das Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico.....	140
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	145
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	147
	<b>ANEXO</b> .....	173



## RESUMO

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

**Palavras-chave:** Doença prion murino, Comportamento doentio, camundongo albino

Suíço, Imunoneuropatologia, C57Bl6J

## ABSTRACT

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

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

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Procedimentos Experimentais e Número de Animais.....	58
Quadro 2 - Animais e Áreas de Interesse Investigados .....	59
Quadro 3 - Passos da reação de imunohistoquímica para NeuN.....	67
Quadro 4 - Passos da reação de imunohistoquímica para astrócitos.....	68
Quadro 5 - Passos da reação de histoquímica para Microglia ativada.....	69
Quadro 6 - Passos da reação de histoquímica para detecção da Rede Perineuronal .....	70
Quadro 7 - Passos da reação de imunohistoquímica para PrP <sup>SC</sup> .....	70
Quadro 8- Passos da coloração de Nissl .....	72

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sumaria as semelhanças e contrastes entre a doença de Alzheimer e a doença prion no que concerne ao quadro neuropatológico justificando a utilização da doença prion como modelo para estudos de neurodegeneração crônica..... 34
- Figura 2 - Princípio do fracionador óptico aplicado ao hipocampo e giro denteado..... 45
- Figura 3 - À esquerda fotomicrografia do sítio de injeção em CA3 (asterístico) indicando o feixe de fibras musgosas (seta) originário do transporte retrógrado da ADB de baixo peso molecular. A direita em maior detalhe as células granulares e as camadas do giro denteado. À direita ampliação para visualização de detalhes de parte da região ilustrada no baixo aumento à esquerda. Mol, molecular; Gr, granular; Pol, polimórfica..... 77
- Figura 4 - Sítio de injeção no GD, mostrando a marcação por ADB na camada granular. A seta aponta para fibras musgosas marcadas por transporte anterógrado a caminho de CA3, a cabeça de seta aponta para corpo celular de célula granular. Escala 200  $\mu$ m..... 77
- Figura 5 - Fotomicrografias em baixo aumento de secções horizontais do cérebro de fêmea adulta do camundongo suíço albino ilustrando os sítios de injeção nos córtices entorrinal lateral (a esquerda) e medial (a direita). Como esperado detectou-se focos de marcação em C1, CA3 e no subiculum assim como nos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado. MEA – Área entorrinal medial; LEA – Área entorrinal lateral; PP – Via perfurante; Escala:250 $\mu$ m..... 78
- Figura 6 - Fotomicrografias em baixo (A, C), médio (B, D) e grande aumento (E) de secções horizontais do cérebro do camundongo albino ilustrando as camadas (coloração de Nissl) e as fibras marcadas pelo transporte de dextrana biotilada a partir do córtex entorrinal. As regiões dentro do quadrado branco (A, C) são ampliadas em B e D para ilustrar as terminações nos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado. Em E, fotomicrografia em alto ganho de um fragmento de axônio isolado ilustrando botões de passagem (seta) e botão terminal (cabeça de seta) MEA – Área entorrinal medial; LEA – Área entorrinal lateral; PP – Via perfurante; IMOL – terço interno da camada molecular; MMOL – terço médio da camada molecular; OMOL – terço externo da camada molecular; GR – camada granular; PO – camada polimórfica. Escala: 250 $\mu$ m..... 79

Figura 7	Fotomicrografias dos sítios das projeções de CA1 duas semanas após injeção iontoforética de dextrana biotinilada em fêmea adulta do camundongo albino Suíço. São ilustrados os focos de marcação anterógrada encontrados no Septum, no Córtex Entorrinal e no Subiculum. A seta na figura em grande aumento ilustra projeção axonal em direção à camada oriens. Escalas: maior aumento 25µm; menor aumento 250µm.....	80
Figura 8 -	Fotomicrografia de secção submetida à imunomarcação seletiva para proteína nuclear NeuN em fatia do giro denteado e parte do hipocampo dorsal (CA3 e CA2) de fêmea adulta do camundongo da variedade suíça albina. Or, oriens; Pir, piramidal; Rad, radiatum; Lac Mol, lacunosum molecular; Mol, molecular; Gr, granular; Po, camada polimórfica.....	81
Figura 9 -	Fotomicrografias em baixo (A), médio (B) e grande aumento (C) para ilustrar a arquitetura do hipocampo e do giro denteado, a extensão e os tipos de redes perineuronais respectivamente em secção do cérebro de um animal sadio. Notar a clara distinção entre os campos hipocámpais CA1, CA2 e CA3 (A), a extensão da rede envolvendo o soma (seta preta) e ramos dendríticos (seta branca) de neurônios hipocámpais (B) e a distinção entre os tipos I e II de redes perineuronais (C) a partir da histoquímica para a <i>Wisteria floribunda</i> biotinilada.....	82
Figura 10	Fotomicrografias de secções reagidas por histoquímica para lecitina <i>Lycopersicum esculentum</i> biotinilada, contracordadas pelo Nissl para detecção de microglias ativadas nas camadas polimórfica do giro denteado, radiatum de CA3 e septum medial para ilustrar o estado de ativação na 15 <sup>a</sup> (linha superior) e 18 <sup>a</sup> (linha inferior) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar a maior ativação no septum e na camada polimórfica do giro denteado em comparação a CA3.....	84
Figura 11	Fotomicrografias de secções reagidas por imunohistoquímica para proteína ácida fibrilar, contracordadas pelo Nissl, para detecção de astrócitos reativos nas camadas polimórfica do giro denteado, radiatum de CA3 e septum medial para ilustrar o número de astrócitos reativos 15 (linha superior) e 18 (linha inferior) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar a maior imunomarcação no septum e na camada polimórfica do giro denteado em comparação a CA3.....	84

Figura 12	Fotomicrografias em baixo aumento de secções provenientes de animais controle (NBH), e infectados com o agente ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação do homogenado cerebral. Notar a redução da atividade histoquímica da matriz extracelular à <i>Wisteria floribunda</i> em CA1 (coluna à esquerda), CA3 (coluna central) e septum (coluna à direita) nos animais infectados pelo agente ME7, 15 (linha central) e 18 (linha inferior) semanas após a inoculação em comparação a reatividade da matriz da secção proveniente do animal inoculado com homogenado cerebral não infectado (NBH) (linha superior). NBH – homogenado cerebral normal; S.P.I – semanas pós-inoculação.....	85
Figura 13	Fotomicrografias das fibras musgosas de animal infectado pelo agente ME7(ME7-18 SPI) e de animal do grupo controle (NBH). As setas em ambas as figuras destacam trecho de uma fibra marcada para ilustrar botões tumefeitos e marcação irregular do axônio no animal doente e marcação homogênea com contornos bem definidos das fibras e dos botões no animal controle.....	88
Figura 14	. Fotomicrografias da região CA1 de secções do hipocampo de um animal ME7 sacrificado 18 semanas após a inoculação. A esquerda imunomarcção para a proteína PrP <sup>Sc</sup> , com inativação parcial da proteína PrP <sup>C</sup> por tripsina e a direita imunomarcção para Neu-N ilustrando vacúolos no parênquima do hipocampo ventral. (*) indicam placa amilóide à esquerda e vacúolo à direita Escalas: baixo aumento 250 µm; grande aumento 25 µm.....	89
Figura 15	Taxas de ativação microglial calculada pelo índice de contraste entre as estimativas do número total de microglias 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1. Notar que a maior taxa de ativação ocorre no septum e a menor em CA1. Diferenças estatísticas significantes foram definidas para valores de $p < 0.05$ .....	97
Figura 16	Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de microglias ativadas (à esquerda) na região septal dos animais inoculados com o agente ME7, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação ao animal inoculado com homogenado cerebral normal (NBH). Não se detectou a presença de microglias ativadas nos animais controles (NBH).....	100
Figura 17	Representação gráfica da curva de regressão linear para estimativas quantitativas envolvendo microglias ativadas e redes perineuronais na região septal medial e lateral de animais infectados pelo agente ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação.....	101

Figura 18	Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de microglias ativadas (à esquerda) em CA1 dos animais inoculados com o agente ME7, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação ao animal inoculado com homogenado cerebral normal (NBH). Não se detectou a presença de microglias ativadas nos animais controles (NBH).....	102
Figura 19	Diferença entre as médias estimadas para os astrócitos da região septal medial dos grupos NBH(1), G2 (2) e G3 (3). Notar que com a progressão da doença a diferença entre o número estimado de astrócitos dos animais infectados e do controle cresce.....	105
Figura 20	Representação gráfica do valor médio e respectivos erros padrão das estimativas do número total de redes perineuronais (à direita) e de astrócitos reativos (à esquerda) na região septal dos animais inoculados com o agente ME7 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação, em comparação aos animais inoculados com homogenado cerebral normal (NBH).....	106
Figura 21	Representação gráfica da curva de regressão linear simples aplicada às estimativas numéricas obtidas pelo fracionador óptico a partir de secções dos animais controle (NBH) e infectados, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 em CA1.....	107
Figura 22	Representação gráfica das estimativas do número médio de astrócitos, microglias e redes perineuronais na região septal medial e lateral dos animais controle (NBH) e ME7, 15 e 18 semanas após a inoculação dos homogenados cerebrais normal e infectado.....	108
Figura 23	Representação gráfica do número estimado de astrócitos e microglias para a camada polimórfica do giro denteado para os animais controle (NBH) e infectados (ME7), 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação. (*) indica diferença estatística significativa (ANOVA, um critério, $p < 0.025$ , para astrócitos ou teste bi-caudal $p < 0.05$ , para microglias).....	111
Figura 24	Representação gráfica do contraste entre as médias das estimativas do número de astrócitos e microglias 15 e 18 semanas após inoculação do agente ME7 na camada polimórfica e na região septal em fêmeas adultas do camundongo Suíço albino.....	113
Figura 25	Representação gráfica da taxa de ativação astrogliar relativa na região septal e polimórfica utilizando o calculo do contraste entre as estimativas do número total de astrócitos obtidos para os grupos NBH e ME7 (G2 e G3).....	114

Figura 26	Ensaio comportamentais comparados para os testes: ponte de bastões, (acima), campo aberto (meio) remoção de ração (abaixo), À esquerda o desempenho dos camundongos Suíços albinos e à direita o da variedade C57BL/6j, medidos em tempo (s), número de quadrados atravessados e gramas de ração.....	122
Figura 27	- Representação gráfica demonstrando a existência de formação de grupos distintos. O grupo ME7-P mostrou-se mais sensível em relação ao grupo controle e ME7-T( $p < 0.05$ ) com quadro clínico precoce (13 <sup>a</sup> e a 14 <sup>a</sup> semanas). O grupo ME7-T mostrou-se mais resistente em relação ao grupo ME7 -P( $p < 0.05$ ) com quadro clínico tardio (21 <sup>a</sup> e a 22 <sup>a</sup> semanas).....	123
Figura 28	Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferencial não homogênea. Fonte: (Gardella et al., 2003).....	139



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros Experimentais e Número de Microglias Ativadas contadas ( $\Sigma Q$ ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> .....	90
Tabela 2	Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	91
Tabela 3	Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Microglia Ativada ( $\Sigma Q$ ) na camada polimórfica do giro denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 <sup>(1)</sup> .....	92
Tabela 4	Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	93
.Tabela 5	Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Microglia Ativada ( $\Sigma Q$ ) em CA1 de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) semanas após a inoculação do agente ME7 <sup>(1)</sup> .....	94
Tabela 6	Estimativa Individual Unilateral do Número de Microglias Ativadas (N) em CA1 de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço com Coeficiente de Erro (CE) para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	95
Tabela 7	Parâmetros Experimentais e Número de Redes Perineuronais contadas ( $\Sigma Q$ ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) e na 18 <sup>a</sup> (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7 e respectivos controles (NBH) <sup>(1)</sup> .....	98
Tabela 8	Estimativa Individual Unilateral do Número de Redes Perineuronais (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) e na 18 <sup>a</sup> (G3)	

	semanas após a Inoculação do Agente ME7 e respectivos controles (NBH) <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	99
Tabela 9	Parâmetros Experimentais e Número de Astrócitos Reativos contados ( $\Sigma Q$ ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> .....	103
Tabela 10	Estimativa Individual Unilateral do Número de Astrócitos Reativos (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	104
Tabela 11	Parâmetros Experimentais e Resultados de Contagem de Astrócitos Reativos ( $\Sigma Q$ ) na Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, 15 (G2) e 18 (G3) Semanas após a Inoculação do agente ME7 <sup>(1)</sup> .....	109
Tabela 12	Estimativa Individual Unilateral do Número de Astrócitos Reativos (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	110
Tabela 13	Parâmetros Experimentais e Número de Neurônios Contados ( $\Sigma Q$ ) na Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço, Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) Semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> .....	115
Tabela 14	Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Região Septal Medial e Lateral de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais dos Grupos Sacrificados na 15 <sup>a</sup> (G2) ou na 18 <sup>a</sup> (G3) semanas após a Inoculação do Agente ME7 <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	114
Tabela 15	Parâmetros experimentais e total de neurônios ( $\Sigma Q$ ), para a Camada Granular do Giro Denteado de fêmeas adultas do camundongo albino Suíço do grupo controle (NBH) e do grupo sacrificado 18 semanas após a inoculação do agente ME7 (G3) <sup>(1)</sup> ....	117

Tabela 16	Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Granular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	118
Tabela 17	Parâmetros Experimentais e Total de Neurônios Contados ( $\Sigma Q$ ), para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 Semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) <sup>(1)</sup> .....	118
Tabela 18	Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Polimórfica do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	119
Tabela 19	Parâmetros Experimentais e Total de Neurônios Contados ( $\Sigma Q$ ), para a Camada Molecular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 Semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) <sup>(1)</sup> .....	120
Tabela 20	Estimativa Individual Unilateral do Número de Neurônios (N) com Coeficiente de Erro (CE) para a Camada Molecular do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço do Grupo Controle (NBH) e do Grupo Sacrificado 18 semanas após a Inoculação do Agente ME7 (G3) <sup>(1)</sup> . Média do Grupo e Estimativas Individuais (Média, N), Desvio Padrão (D.P.) e Coeficientes de Erro Individuais e Médios (CE).....	120
Tabela 21	Números Estimados para as Camadas Granular, Polimórfica, Molecular e total do Giro Denteado de Fêmeas Adultas do Camundongo Albino Suíço para os Animais NBH e ME7, 18 Semanas após as Inoculações.....	121
Tabela 22	Sumário dos achados encontrados em diferentes janelas temporais para as duas variedades estudadas.....	135

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo as projeções estatísticas da Organização Mundial da Saúde, entre 1950 e 2025, a população de idosos no Brasil crescerá 16 vezes contra 5 vezes da população mundial, o que nos colocará em termos absolutos como a sexta população de idosos do mundo (Garrido e Menezes, 2002). Para o planejador de políticas públicas esse aumento da expectativa de vida arrasta consigo impacto econômico sobre as contas públicas que deve ser prontamente medido pelo fato amplamente reconhecido de que os maiores gastos com saúde se dão no último ano de vida em decorrência do acréscimo correspondente das necessidades de cuidados de enfermagem domiciliar, que exigem cerca de quatro vezes mais recursos (Wick G, 2000).

Além disso essa expansão da vida trouxe consigo o aumento da prevalência de uma série de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, com a doença de Alzheimer assumindo a primeira posição em importância. De fato em 1996, já se detectara que a maior percentagem de óbito por quantidade de internações registradas no SUS, deveu-se a Doença de Alzheimer (6,6%) e desde então esse número só tem aumentado, o que demonstra o elevado custo que essa doença representa para a sociedade. Esses e outros achados confirmam que o idoso, em relação às outras faixas etárias, consome muito mais do nosso Sistema de Saúde e que este maior custo não reverte em seu benefício. Assim, é útil e importante investigar as bases biológicas das doenças crônicas neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, sendo as

despesas decorrentes de projetos dessa natureza de interesse público e essenciais para gerar evidências que permitam ao formulador de políticas de saúde tomar decisões acertadas (Kalaria, Maestre *et al.*, 2008).

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

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

Estudos prospectivos feitos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que em 2020, o mundo contará com mais de 400 milhões de idosos. Realmente 20% da população do mundo industrializado já está acima de sessenta anos de idade e a proporção daqueles acima de 85 anos está crescendo seis vezes mais rápido do que a população como um todo. Desse contingente cerca de 50% torna-se demente como uma consequência de processos neurodegenerativos. Dentre todos os países são os do

terceiro mundo que em números absolutos detem hoje a maioria das pessoas com sessenta anos ou mais e daqui a menos de 30 anos em função da rápida substituição das grandes populações idosas dos países europeus pelas de “países jovens” oitenta deles substituirão as populações mais velhas (Kalaria, Maestre *et al.*, 2008; Prince, Acosta *et al.*, 2008).

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

Na população idosa, as doenças crônicas neurodegenerativas são um sério e complexo problema a ser resolvido de alta importância epidemiológica. As duas doenças mais diagnosticadas são o Mal de Parkinson e o de Alzheimer, com esta última em maior prevalência (Qiu, De Ronchi *et al.*, 2007). Os registros do SUS revelam que em 1996, 100.000 a 600.000 casos de demência foram diagnosticados e motivaram internações em nosso país. Considerando que a doença de Alzheimer representa em torno de 50% desses casos e que a sobrevivência média de seus portadores seria de 15 anos após o início da mesma, teríamos cerca de 15.000 a 20.000 casos de morte por Alzheimer por ano. As instituições públicas parecem atentas para o fato e iniciaram alterações de infra-

estrutura adaptadas ao idoso assim como deram partida ao treinamento maciço de profissionais da área da saúde para permitir cuidado especializado aos mais de 32 milhões de idosos esperados em 2020 (ver o documento “Programa de Saúde do Idoso” em [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br) )

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

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

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

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

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

## 1.2 ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL EM CÉREBROS NORMAIS.

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



maior precisão através da utilização da histoquímica para revelação de terminais de açúcares (glicosaminoglicanos) presentes na matriz extracelular e nas redes perineuronais facilitando sua análise individual. A distribuição desses açúcares distingue CA2 de CA1 e CA3 em função da maior concentração daqueles na matriz extracelular de CA2. Para reconhecer sua distribuição na matriz utiliza-se a lectina *Wisteria floribunda* conjugada com biotina ou com fluoresceína que reage com glicosaminoglicanos ligados aos proteoglicanos da matriz de forma seletiva indicando os locais de sua ocorrência (Bruckner et al., 2003b). A área entre o GD e o *stratum pyramidale* de CA3 é chamada de Polimórfica ou região hilar ou simplesmente hilus (Brown and Zador, 1990 ). O hipocampo apresenta fundamentalmente três camadas, a camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*) e camada molecular (*stratum radiatum e stratum lacunosum-moleculare*). O GD consiste em camada polimórfica (hilus), camada granular (*stratum granulosum*) e a camada molecular (*stratum moleculare*) que é continua com o hipocampo (Brown and Zador, 1990 ). Os principais neurônios do hipocampo são os neurônios piramidais de CA1, CA2 e CA3 e as células granulares do GD. As conexões sinápticas no hipocampo são geralmente axodendríticas e axosomáticas e os principais neurotransmissores são, GABA, norepinefrina e acetilcolina (Brown and Zador, 1990 ).

O hipocampo é considerado por alguns como uma das mais complexas áreas de associação multimodal (Swanson, 1983), parcialmente porque este recebe e integra informação de todas as modalidades sensoriais. O hipocampo compreende assim várias áreas com propriedades diferentes que ainda não estão bem estabelecidas (Eichenbaum, 2006; Kesner et al., 2004; Rolls and Kesner, 2006; Squire et al., 2004)

mas é a presença do giro denteado que distingue a formação hipocampal dos mamíferos de outras classes que embora possuam a formação hipocampal, não contam com o trabalho do giro denteado de amplificar os sinais provenientes do córtex entorrinal a caminho das células piramidais de CA3 (van Groen et al., 2002). As células em CA3 recebem sobre seus dendritos apicais projeções diretas da camada II do córtex entorrinal através da via perfurante que em seu caminho emitem colaterais axonais que fazem sinapse com as células granulares do giro denteado cujos axônios constituem as fibras musgosas. Estas últimas se projetam para CA3 conectando-se às células piramidais em região próxima ao soma, replicando e intensificando o sinal que receberam através da via perfurante.

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

entorrinal para o hipocampo as projeções septo-hipocampais que parecem estar envolvidas com o comportamento exploratório e a memória operacional espacial. Realmente, há evidências de que lesões produzidas no septum medial prejudicam a organização do comportamento exploratório assim como diminuem a taxa de aprendizado de localização da plataforma escondida no labirinto aquático de Morris (Martin et al., 2007). Durante o envelhecimento essas projeções ao serem danificadas, são fortemente correlacionadas aos déficits de memória de trabalho e.g. (Fischer et al., 1989; Ingram et al., 1981; Markowska et al., 1995). Além disso a modulação intraseptal de receptores muscarínicos tem contribuição importante sobre a projeção septo-hipocampal colinérgica, alvo principal das alterações neuropatológicas associadas a déficits de desempenho em tarefas hipocampo-dependentes associadas ao envelhecimento (Elvander et al., 2004).

Mas é através do giro denteado que o córtex entorrinal exerce sua maior influência no hipocampo. O que se tem denominado de giro denteado nos mamíferos é uma estrutura trilaminar, com as características do córtex primitivo ou alocórtex composto pelas seguintes camadas: molecular, granular e hilar ou polimórfica. A região mais externa, a camada molecular é relativamente livre de células e contém os dendritos das células granulares, os terminais da via perfurante e as fibras intrínsecas de associação e comissurais das células musgosas (Houser, 2007; Leranth and Hajszan, 2007). A camada molecular recebe de forma segregada os axônios do córtex entorrinal medial e lateral com o terço médio sendo reservado às projeções do primeiro e o terço externo ao último (Witter and Moser, 2006). A camada de células principais é composta por um aglomerado de células densamente compactadas denominadas de

células granulares com corpos celulares com 8 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro que projetam dendritos que se bifurcam muito próximos ao soma e que ocupam a camada molecular (Amaral et al., 2007). A terceira camada que corresponde à região hilar, de disposição mais profunda no giro denteado, está subjacente à camada de células granulares, estendendo-se até as proximidades dos dendritos das células piramidais de CA3. Por essa vizinhança com CA3 a camada granular é subdividida em lâminas designadas supra e infra-piramidais de acordo com sua posição em relação à camada de células piramidais de CA3. No hilo, as células musgosas são os neurônios mais freqüentes, mas mesmo assim são 25 a 30 vezes menos abundantes do que as células granulares (Amaral et al., 2007). Apesar desse número reduzido as células musgosas da região hilar realizam um papel importante na modulação da eferência do giro denteado. De natureza glutamatérgica as células musgosas correspondem à metade da população neuronal do hilo, enquanto vários grupos de interneurônios inibitórios gabaérgicos constituem a metade restante (Amaral, 1978). As propriedades anatômicas e fisiológicas das células musgosas levaram à hipótese de que elas possuem um papel importante na coordenação das funções hipocampais normais, uma vez que déficits de memória e aprendizado são freqüentemente observados em animais com danos nos neurônios hílares. As células musgosas estão envolvidas em modular especificamente a atividade da célula granular em sua projeção para CA3 e integram a função hipocampal em áreas anatômicas mais vastas; no entanto, o amplo campo de conectividade da célula musgosa pode predispor-las a morte celular excitotóxica (Magloczky and Freund; 2005; Magloczky and Freund, 1993).

Somam-se a essas ações modulatórias as aferências excitatórias do córtex

entorrinal que representam o maior conjunto de aferências extrínsecas para o giro denteado (van Groen et al., 2002; van Groen et al., 2003) e cuja integridade parece essencial para todas as tarefas hipocampo-dependentes tais como consolidação do aprendizado e formação de memória episódica (Eichenbaum et al., 2007; Witter, 2007; Witter and Moser, 2006). Dando suporte a essa premissa há uma série de evidências experimentais implicando os córtices perirrinal, pósrrinal e entorrinal em processos fisiológicos que estão associados ao reconhecimento da identidade e da localização de objeto. Essas funções permanecem largamente segregadas nos córtices perirrinal e parahipocampal projetando-se separadamente para os córtices entorrinal medial e lateral respectivamente (Lipton and Eichenbaum, 2008). Dos córtices entorrinais medial e lateral em diante, as vias convergem sobre o hipocampo (CA1, CA2, CA3) e o giro denteado através das vias perfurantes medial e lateral que ao se dirigirem ao giro denteado contatam respectivamente os terços médio e externo da camada molecular ocupados pelos dendritos das células granulares (Amaral et al., 2007; Dolorfo and Amaral, 1998a; van Groen et al., 2002; van Groen et al., 2003). Embora todas essas projeções tenham origem nas camadas II ou III dos córtices entorrinal medial e lateral, há outra projeção menos densa, originada nas camadas V e VI do córtex entorrinal, que ocupa o terço interno da camada molecular do giro denteado (Deller et al., 1996). Tomados em conjunto, os dados revelam que a célula granular do giro denteado recebe simultaneamente as projeções das vias responsáveis pelas tarefas de reconhecimento, da localização espacial e da forma dos objetos deixando em aberto o significado funcional dessa convergência.

A perda de neurônios hilares relacionadas com a idade é provavelmente

resultado de aumento da morte celular decorrente do estresse oxidativo (Kiatipattanasakul et al., 1996) possivelmente devido à deposição beta-amilóide (Tapp et al., 2004), a inflamação subsequente, o dano oxidativo (Head et al., 2002) e o dano no DNA (Anderson et al., 2002). A inflamação no sistema nervoso central é caracterizada por complexas formas de resposta celular e molecular ao estresse, ao dano por traumatismos ou por infecção, numa tentativa de defender o cérebro contra os danos instalados, removendo debris celulares e neurônios lesados trazendo o ambiente cerebral de volta a homeostase. A inflamação no SNC é disparada pela ativação da microglia, astrócitos e macrófagos periféricos infiltrantes que liberam uma plethora de citocinas anti e pro-inflamatórias, quimiocinas, neurotransmissores e radicais livres em função da severidade da inflamação (Whitney et al., 2009).

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

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

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

Três elementos comuns parecem contribuir de forma aditiva para os danos

neuropatológicos observados nas doenças prion e na doença de Alzheimer: a neuroinflamação, o estresse oxidativo e o dano vascular. Doenças prion são caracterizadas por depósito extracelular de fibrilas amilóides protease-resistentes denominadas PrP<sup>Sc</sup> que constituem isoformas da proteína PrP<sup>C</sup> largamente distribuída no SNC (Oesch et al., 1985; Prusiner, 1991). A proteína PrP<sup>C</sup> parece ser essencial a uma variedade de funções e sua alteração durante a progressão da doença concorre para uma série das alterações observadas. A resposta microglial intensa medida através de imunomarcação específica nas regiões afetadas do SNC, de pacientes com Alzheimer, com a doença prion humana de Creutzfeldt-Jacob e em modelos murinos de doença prion caracterizam a presença de resposta inflamatória local que se agrava e se mantém ao longo da doença (Eikelenboom et al., 2002; Lucassen et al., 1995; Sasaki et al., 1993; Williams et al., 1994a; Williams et al., 1994b). Assim o aparecimento dos depósitos amilóides parece estar associado à resposta inflamatória crônica, atípica, que parece constituir denominador comum dos processos patogênicos encontrados na doença prion e na doença de Alzheimer. O melhor argumento para essa descrição decorre das observações histopatológicas e imunohistoquímicas de recrutamento e acumulação local de microglia (fagócitos residentes no SNC) preenchendo o critério clássico proposto por Metchnikoff em 1892 para caracterizar a presença de um processo inflamatório. A atipia na doença prion é confirmada pela presença de apenas dois dos principais mediadores inflamatórios elevados, a prostaglandina E2 e o fator de crescimento  $\beta$ 1 (transforming growth factor-  $\beta$ 1), mas com 3 das citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sem mudança significativa (Perry et al., 2002). Além disso a ativação microglial característica



da resposta inflamatória ocorre em regiões de perda sináptica ao invés de nas áreas de depósito de PrP<sup>SC</sup> (Cunningham et al., 2003). Assim, a expressão atípica é reservada para o fato de que não preenche todos os critérios exigidos para caracterizar uma resposta inflamatória completa enquanto que a expressão crônica é reservada para explicitar o fato de que ela não se resolve ao longo do tempo tornando-se crônica (Eikelenboom et al., 2002).

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

De forma análoga, estudos topográficos empregando microressonância magnética (muMRI) em modelo murino de doença prion com campo magnético de alta resolução (9.4 Tesla), revelaram as primeiras mudanças de sinal ponderado em T2 no septum e no hipocampo 12 semanas após a inoculação, e alterações intensas associadas a graves déficits neurológicos 24 semanas depois (Sadowski et al., 2003). Estudos complementares quantificando as mudanças observadas nas imagens de

ressonância magnética e espectroscopia por ressonância magnética revelaram alterações detalhadas da fase pré-clínica coincidentes com a ativação microglial, a hiperatividade no campo aberto e a presença de perfis alterados de metabólitos revelados pela espectroscopia e.g. (N-acetil aspartato/colina e N-acetil aspartato/creatina) no tálamo e hipocampo (Broom et al., 2007). Resultados de espectroscopia semelhantes foram obtidos nas fases iniciais da doença em modelo murino, utilizando homogenado cerebral derivado de encefalopatia espongiforme bovina (Vidal et al., 2006).

Outro achado celular tão relevante quanto a alteração microglial é a astrocitose hipertrófica, com regulação para cima da proteína ácida fibrilar (GFAP) e das enzimas astrocíticas coincidentes com a elevação de PrP antes do aparecimento das lesões neuropatológicas (Kovacs and Budka, 2008). Na verdade astrócitos e neurônios parecem ser os maiores sítios de replicação do agente infectante da doença prion induzindo sinalização precoce através de quimiocinas que conduzem ao recrutamento microglial subsequente (Mathieu and Chabry, 2004). As ações dos astrócitos diante de um processo indutor de lesão crônica tal como na doença prion e na doença de Alzheimer que arrastam consigo ativação astrocitária igualmente crônica, parecem ir além das ações benéficas identificadas nas lesões agudas, contribuindo para aumentar o dano tecidual fazendo a doença progredir (Mraka and Griffin, 2001). Essas ações parecem estar associadas a superexpressão da proteína S100B, um mensageiro químico intercelular em astrócitos ativados (Sheng JG et al., 1994). Dezenove proteínas da família S100 foram descritas expressando-se em vários tecidos envolvidas com a regulação intracelular de cálcio associado à múltiplas funções cálcio dependentes tais

como fosforilação de proteínas, atividades enzimáticas, proliferação e diferenciação celular, construção e reparo do citoesqueleto assim como homeostase do cálcio propriamente (Donato, 1999). Dentre essas, a S100B é a mais abundante nas células da glia do sistema nervoso central onde parece contribuir para o crescimento de neuritos e a sobrevivência de subpopulações neuronais pós-lesão e durante o desenvolvimento, assim como estimula a proliferação e hipertrofia de astrócitos (Griffin et al., 1995; Shashoua et al., 1984). Astrócitos ativados são componentes indissociáveis das placas amilóides na doença de Alzheimer onde são encontrados na periferia daquelas envolvendo os depósitos amilóides com processos espessos que envelopam a placa e finos que se expandem para o centro dela (Mandybur and Chuirazzi, 1990). É possível entretanto encontrar astrócitos ativados nos estágios iniciais da doença antes da formação de placas propriamente, quando o depósito amiloide ainda é difuso (Mrak et al., 1996). Pacientes com distúrbio cognitivo leve, nas fases iniciais da doença, mostram um aumento expressivo do número de astrócitos associados a um reduzido número de placas enquanto que em pacientes nos estágios finais, o número de astrócitos associados à placas está diminuído, sugerindo que a astrocitose reativa parece contribuir principalmente para a patologia dos estágios iniciais (Pike et al., 1995).

A análise ultraestrutural aplicada a doença prion em modelo murino induzida pelo agente ME7, revelou a presença de vacúolos em astrócitos, oligodendrócitos, mielina, em dendritos, no soma neuronal e em menor freqüência em terminais axonais, (Jeffrey et al., 1995). Além disso, esses estudos identificaram perda sináptica no hipocampo decorridos 40% da extensão temporal da doença coincidindo com o

aparecimento das placas amilóides (Jeffrey M et al., 2000). Varicosidades, aparecimento de esferóides e decréscimo das espinhas dendríticas apareceram de forma mais freqüentes nos estágios terminais, mas já podem ser detectados tão cedo quanto decorridos 50% do curso temporal (Jeffrey et al., 2001).

Em estudo mais recente no C57Bl6J, onde a doença cursa até sua fase terminal em 175 dias após a injeção intrahipocampal do agente ME7, foi demonstrado o aparecimento de alterações neuropatológicas mais precoces no hipocampo ventral do que as descritas para o hipocampo dorsal (Franklin et al., 2008). Nesse trabalho os autores demonstram que oito semanas após a injeção intrahipocampal já se encontra ativação da microglia, presença de astrócitos reativos, placas amilóides ocasionais, além de 10% de perda de redes perineuronais de CA1 marcadas pela Wisteria floribunda.

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

A Figura 1 modificada de (Eikelenboom et al., 2002) sumaria as semelhanças e

contrastes entre a doença de Alzheimer e a doença prion no que concerne ao quadro neuropatológico justificando a utilização da doença prion como modelo para estudos de neurodegeneração crônica.

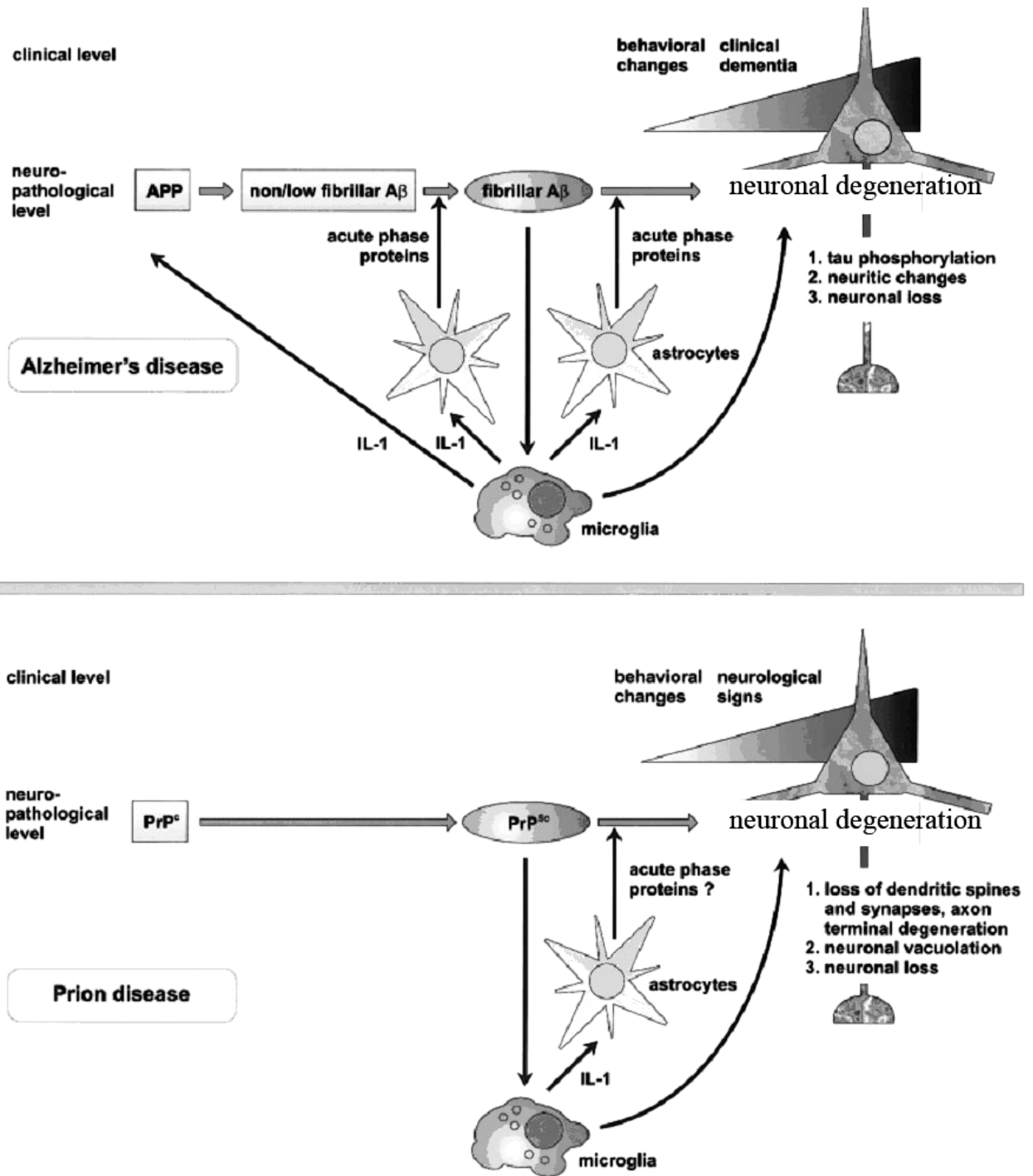


Fig. 1. Tanto a Doença de Alzheimer quanto as doenças prion são caracterizadas por seqüência de eventos que tem em comum a deposição extracelular de placas amiloides no parênquima. Nos dois

casos as placas geram alteração dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e ativação microglial formando agrupamentos no parênquima. A resposta inflamatória crônica antecede a destruição da neurópila em ambos os casos. Na doença de Alzheimer há forte correlação entre o aumento dos níveis séricos de interleucina 1 $\beta$  e o aumento da síntese da proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP) que por sua vez está associada ao aumento da formação de placas gerando ciclo de retroalimentação positiva que faz a doença progredir. Na figura enfatiza-se a ausência de evidências para esse ciclo de retroalimentação na doença prion (Eikelenboom et al., 2002).

Além da neuroinflamação, também contribui para as alterações neuropatológicas da doença prion o estresse oxidativo. A forte ligação entre estresse oxidativo e doença prion é revelada por duas categorias de eventos patofisiológicos que ocorrem durante a progressão da doença: (1) aumento de produção de espécies de oxigênio reativo (ROS) e espécies de nitrogênio reativo (RNS), seguida por danos celulares oxidativos diretos e (2) interrupção da defesa contra o estresse oxidativo celular (Unterberger et al., 2005). Outras evidências obtidas a partir de imunohistoquímica para marcadores de estresse oxidativo tais como nitrotirosina, um indicador de geração de peroxinitrito (Smith et al., 1997), heme oxigenase-1 (HO-1) enzima responsável pela formação de moléculas antioxidantes (Smith et al., 1994), assim como marcadores de oxidação lipídica (Wong et al., 2001), revelaram aumento importante da quantidade de imunomarcagem de neurônios na fase terminal da doença sugerindo fortemente que o estresse oxidativo contribui para o dano neuronal nas encefalopatias espongiformes (Brown, 2005). De fato há um conjunto de evidências da presença de estresse oxidativo tardio na doença prion por detecção de danos oxidativos em proteínas (Kim et al., 1999), lipídios (Kim et al., 2000; Minghetti et al., 2000), DNA (Guentchev et al., 2000) e por alterações da atividade de enzimas antioxidantes (Choi et al., 2000; Thackray et al., 2002). Igualmente tem sido sugerido que a proteína prion (PrP<sup>C</sup>) tem papel crucial na resistência ao estresse oxidativo associado a ativação microglial nas encefalopatias espongiformes e.g. (Brown and Kretzschmar,

1997). Nesse sentido tem sido utilizado estratégia indireta para elucidação da patogênese da doença prion tentando explorar o papel fisiológico da PrP<sup>C</sup>. Nesses trabalhos as atenções se voltaram para a região estrutural N-terminal da proteína PrP<sup>C</sup> que contém uma única seqüência octapeptídica repetida (van Rheede et al., 2003). Usando peptídeos correspondentes para três das octarepetições de PrP em mamíferos, demonstrou-se uma ligação específica e preferencial a íons de cobre divalentes (Hornshaw et al., 1995). A ligação ao cobre influencia as propriedades estruturais e bioquímicas de PrP<sup>C</sup> (Qin et al., 2000) preservando o papel importante na defesa celular contra o estresse oxidativo da PrP<sup>C</sup> uma vez que o aumento de sua concentração é associada ao aumento da resistência ao dano oxidativo (Brown and Kretschmar, 1997). Em concordância com essa idéia, a atividade aumentada de cobre/zinco-superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), enzimas que contribuem para a proteção contra o dano oxidativo, foi encontrada em células neuronais que expressavam níveis altos de PrP<sup>C</sup> (Rachidi et al., 2003). Em camundongos no estágio final de scrapie foi demonstrada por imunohistoquímica uma marcação neuronal difusa para nitrotirosina (NT), um marcador de oxidação (nitrosilação) de proteína (Unterberger et al., 2005). Além disso, marcação aumentada de heme oxigenase-1(HO-1) foi igualmente observada por imunohistoquímica (Guentchev et al., 2000).

Finalmente um terceiro componente fisiopatológico das doenças crônicas neurodegenerativas é a insuficiência microcirculatória devido à alterações regionais da estrutura dos capilares durante o envelhecimento, que parece danificar o sistema de liberação do óxido nítrico (ON), um potente neuromediador associado a uma série de

funções dentre as quais o controle do fluxo sanguíneo cerebral (de la Torre and Stefano, 2000; Jiang et al., 2002; Lovick et al., 1999; Montecot et al., 1998), potenciação de longo prazo (LTP) e consolidação de processos relacionados a contribuição hipocampal para formação de memória (Bohme et al., 1993; Haley et al., 1992). A vasodilatação mediada por óxido nítrico decorre do relaxamento do músculo liso em resposta ao estímulo mecânico do endotélio ou a estimulação produzida por acetilcolina, bradicinina ou outro composto (Arnal et al., 1999). Esses estímulos químicos e mecânicos levam ao aumento da concentração de cálcio citosólico e ativação do complexo cálcio-calmodulina e das enzimas de síntese do óxido nítrico nas células endoteliais (Fleming and Busse, 1999) que por sua vez aumenta a produção de ON aumentando a expressão gênica ou a atividade da sintase de ON endotelial, e-NOS (Arnal et al., 1999). Além disso o ON liberado pode se originar de terminais axonais que contribuem para o controle da regulação do relaxamento endotelial (Farkas and Luiten, 2001). Durante o envelhecimento uma série de alterações afetam a rede capilar encefálica incluindo depósito de colágeno perivascular (fibrose microvascular) e o espessamento da membrana basal do capilar que dobra a espessura da parede em relação ao capilar normal, especialmente no córtex entorrinal e hipocampo (De Jong et al., 1991; Luiten et al., 1994). Esse espessamento parece contribuir para dificultar o transporte de nutrientes e eletrólitos através da membrana capilar induzindo possivelmente os déficits cognitivos do período senescente por diminuição da oferta de nutrientes e perda da homeostase eletrolítica (Farkas and Luiten, 2001). Tem sido sugerido que na doença de Alzheimer a formação de placas amilóides agravaria o espessamento da membrana basal do capilar além de ativar a reação microglial



associada ao dano celular de uma forma geral comprometendo igualmente a atividade nitrérgica endotelial e neuronal, ampliando o déficit no fluxo sanguíneo dependente de óxido nítrico (de la Torre and Stefano, 2000; Farkas and Luiten, 2001; Law et al., 2001). Nas doenças prion também tem sido descrito a presença de dano nitrérgico através da medida das enzimas de síntese do óxido nítrico que parecem estar reduzidas e anormalmente localizadas principalmente nas fases mais avançadas da doença (Ovadia et al., 1996). No modelo murino C57Bl6J demonstrou-se que parece haver um padrão bifásico de ativação das enzimas nitrérgicas com regulação para cima nas camadas hipocampais, 13 semanas após a indução da doença, quando as primeiras alterações comportamentais se tornam aparentes, seguida de devastadora regulação para baixo nos estágios avançados da doença (Picanco-Diniz et al., 2004). Nesse momento detectam-se redução no consumo de glicose, na remoção e estocagem de comida e aumento da atividade exploratória no campo aberto associadas à mudanças neuropatológicas no sistema límbico (Cunningham et al., 2003). Em torno de duas semanas antes da fase terminal instalam-se alterações da atividade locomotora e da postura que caracterizam a fase clínica da doença e onde se observam as alterações nitrérgicas mais dramáticas (Hunter et al., 1986; Picanco-Diniz et al., 2004).

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

ocorrência de inflamação, não se caracterizam como resposta à neurodegeneração.

Todas essas transformações neuropatológicas contribuem para gerar alterações comportamentais que podem revelar antecipadamente os circuitos neuroanatômicos que estão sendo comprometidos durante a progressão da doença, não importa a espécie infectada pelo agente prion (Bruce et al., 1991). No caso do modelo murino, de maior interesse para o presente trabalho, uma série de testes comportamentais antecipam sinais de progressão da doença muito antes do animal entrar na fase clínica, permitindo correlações estreitas com as mudanças neuropatológicas (Cunningham et al., 2003; Deacon et al., 2005). Com acesso livre a observação direta do cérebro doente em diferentes janelas temporais é possível estudar no modelo murino cada mudança comportamental a luz das alterações celulares e moleculares subjacentes. Por exemplo, já está descrito para o modelo C57Bl6J que as alterações comportamentais mais precoces da doença (Betmouni et al., 1999; Deacon et al., 2001a; Guenther et al., 2001) coincidem com alterações sinápticas hipocámpais (Cunningham et al., 2003). Esses animais demonstram declínio progressivo na polidipsia induzida por glicose, diminuição no comportamento de remoção e estocagem de comida (“burrowing”) e redução na construção de ninhos, 12 semanas após a inoculação do homogenado cerebral infectado pelo agente ME7 (Cunningham, 2005). Dentre todos os testes comportamentais até o presente, a mensuração da remoção e estocagem de comida em modelo murino C57Bl6J parece ser o teste mais sensível na fase inicial da doença (Cunningham, 2005). Esses comportamentos naturais instintivos que são alterados pela doença, fazem parte de um repertório de respostas neurais coletivamente denominadas de comportamento doentio

que é induzido pela liberação de citocinas (Konsman et al., 2002). No modelo murino C57Bl6J utilizado no presente trabalho para comparação com a variedade Albina Suíça, tem sido demonstrado que o stratum radiatum do hipocampo, o septum medial e lateral e o córtex entorrinal são as primeiras áreas a exibirem ativação microglial após a injeção do agente ME7 e essa ativação coincide com as alterações comportamentais mais precoces, sugerindo possível correlação entre a ativação microglial nas áreas afetadas e o comportamento alterado (Cunningham, 2005; Cunningham et al., 2003).

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

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

A principal motivação para tal é de que embora tenham sido realizados ensaios quantitativos em camundongos da variedade C57Bl6J revelando que nas fases iniciais

da doença há astrocitose e ativação da microglia sem perda neuronal detectável e que a partir da 19ª semana pós-injeção, há perda aparente de 40% dos neurônios de CA1 (Cunningham et al., 2003) e presença de vacuolização, não há até o presente, esforço sistemático para quantificar os achados neuropatológicos empregando análise estereológica sem viés. Além disso, um único estudo foi dedicado às alterações da matriz extracelular em modelo murino e os métodos empregados para quantificação não empregaram procedimentos estereológicos (Franklin et al., 2008a)

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

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

fracionador óptico, é interessante rever, ainda que superficialmente, suas bases conceituais.

A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como menores, maiores, mais largas, menos freqüentes, mais freqüentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (Schmitz and Hof, 2005). Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes apresentam resultados controversos que se devem à suposições prévias acerca do tecido e da geometria das células e de suas distribuições no plano da secção (Geinisman et al., 1995; Mayhew and Gundersen, 1996). Esses estudos quantitativos eventualmente introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (Gardella et al., 2003; Howard and Reed, 2005; Mandarin-de-Lacerda, 2003; Mayhew and Gundersen, 1996), confocal (Kubinova and Janacek, 2001; Peterson, 1999) ou eletrônica (Fiala and Harris, 2001; Nyengaard and Gundersen, 2006). A análise microscópica em qualquer nível é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto é necessário considerar que se um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original será de fato analisada em detalhe (Howard and Reed, 2005; Schmitz and Hof, 2005). Para contornar tais vieses empregam-se técnicas estereológicas que estimam o número total dos objetos contidos em uma dada região de interesse através

de coleta de informação aleatória e sistemática multiplicando-se o número de elementos de interesse registrados pelos valores de probabilidade da amostra e.g. (West, 2002). O termo sem viés é utilizado para definir sistemas de amostragem que são independentes das propriedades do tecido onde as dimensões da sonda (caixa de contagem) e os parâmetros amostrais a ela associados (número e intervalo entre elas) são definidos *a priori*, desprezando-se a coleta de dados acerca do tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (Glaser and Glaser, 2000). Assim, os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas, sem conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado e.g. (Glaser and Glaser, 2000; Schmitz and Hof, 2005; West, 2002).

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

#### **1.4.1 O Fracionador Óptico em Ação**

O alvo do presente trabalho é estimar o número de células dentro de um

volume específico de tecido, o septum, o hipocampo e o giro denteado, usando investigação estereológica sem viés. Em estereologia esse problema é resolvido utilizando caixas de contagem virtuais (sondas estereológicas) aplicadas a uma série ordenada de secções histológicas obtidas das regiões de interesse. É possível seccionar opticamente as secções histológicas usando objetivas de grande abertura numérica para produzir imagens de baixa profundidade de foco. O plano de foco (ou secção óptica) pode ser deslocado através de distancias conhecidas através da espessura da secção produzindo planos de foco contínuos através dos quais a contagem é feita de acordo com as regras de contagem do disector escolhido. Na prática o que acontece é a inclusão na contagem de objetos novos que entram em foco (ou saem de foco) enquanto descemos ou subimos dentro da caixa de contagem de volume conhecido.

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

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

$$X = x/f,$$

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

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



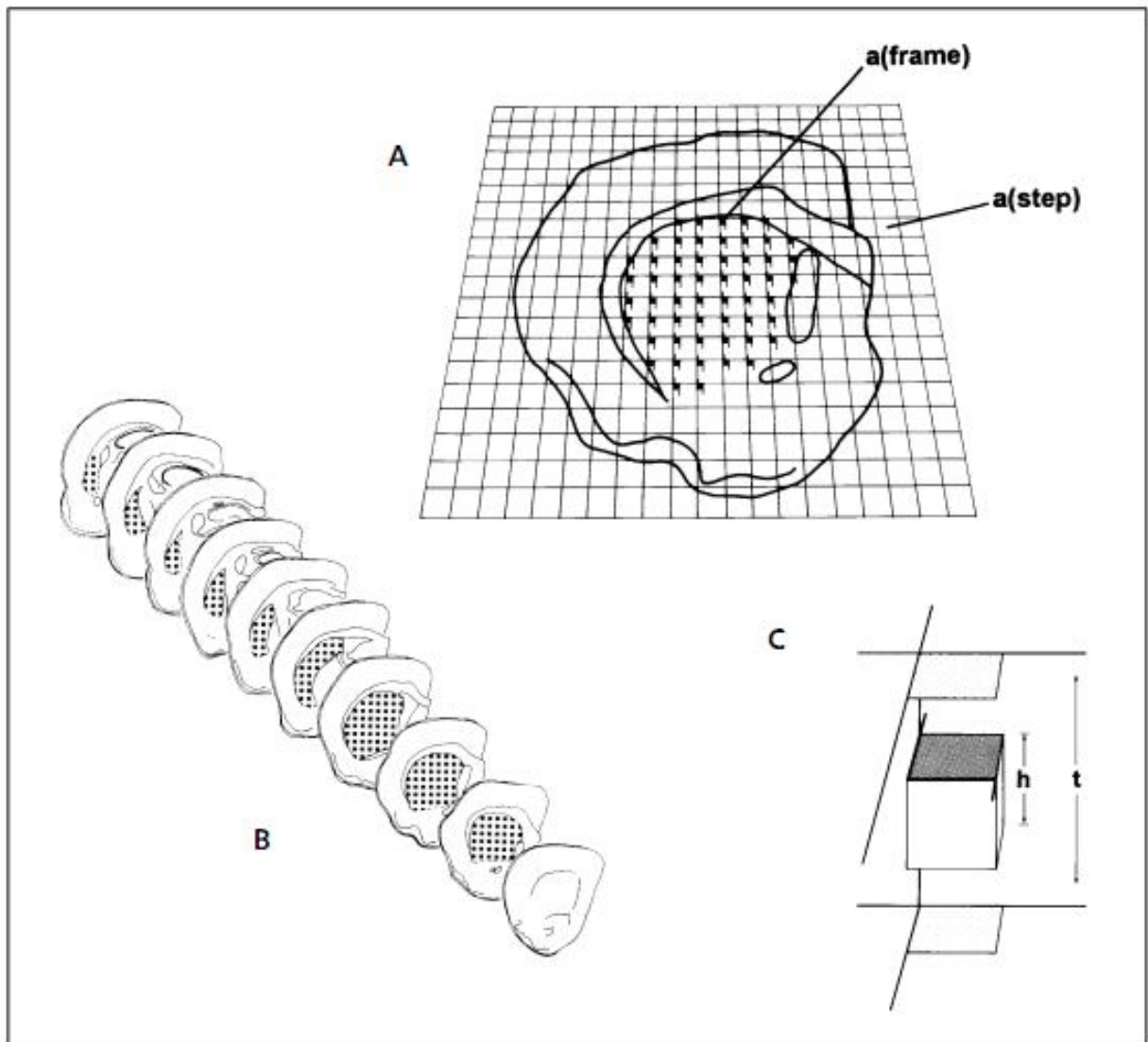


Fig. 2. Representação diagramática do fracionador óptico para a estimativa do número total de neurônios que expressam RNAm para somatostatina no estriado do rato (ref). A) amostra sistemática e aleatória de 10-13 secções do estriado são selecionadas para a análise. As secções são selecionadas em intervalos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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NeuN é uma proteína nuclear específica de neurônios, encontrada no núcleo e parte do citoplasma da vasta maioria de tipos neuronais do sistema nervoso dos vertebrados. Por conta da especificidade de sua expressão ele tem sido referido como um marcador universal do fenótipo neuronal maduro (pós-mitótico) e é usado para distinguir neurônios de células da glia, assim como de outras células que não expressam NeuN (Darlington et al., 2008; Kumar and Buckmaster, 2007). Assim, anticorpos monoclonais dirigidos contra a proteína NeuN do núcleo neuronal, marcam seletivamente o núcleo e parte do citoplasma de neurônios maduros em todas as regiões neurais até então estudadas (Ambrogini et al., 2004; Darlington et al., 2008; Edgar and Rosenblum, 2008; Magavi et al., 2000). São exceções à regra as células de Purkinje e os interneurônios do cerebelo, as células mitrais do bulbo olfatório, os fotorreceptores da retina, os neurônios da cadeia simpática, e finalmente no gerbil, a substância negra *pars reticulata* (Kumar and Buckmaster, 2007). Na formação hipocampal do camundongo em particular, objeto de interesse do presente trabalho, uma série extensa de estudos confirma essa observação tanto em animais saudáveis quanto em doentes e.g. (Brandt et al., 2003; Clark et al., 2008; Kempermann et al., 2003; Takahashi et al., 2008; von Bohlen Und Halbach, 2007; Zhao et al., 2008). O anticorpo monoclonal empregado no presente trabalho (MAB377, Chemicon, Temecula, CA) dirigido contra o epítipo murino de NeuN reage positivamente em uma variedade de espécies sugerindo que é conservado por todas elas e isso inclui pássaros, outros roedores e humanos (Kumar and Buckmaster, 2007).

No presente trabalho os ensaios hodológicos empregaram a dextrana biotinilada e a citoarquitetonia utilizou imunomarcação seletiva da proteína nuclear de

neurônios NeuN, e a histoquímica para lecitina Wisteria floribunda para marcação de proteoglicanos da matriz extracelular para definição dos limites de CA1, CA2 e CA3 e dos núcleos septais preenchendo o critério de definição inambígua da área e dos objetos de interesse.

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

As razões para essa escolha são descritas a seguir.

A matriz extracelular (ME) do tecido nervoso é formada por uma complexa rede de proteínas e carboidratos secretados tanto por neurônios quanto por células gliais e difere da ME de outros tecidos por suas propriedades bioquímicas, composição molecular e complexidade de função (John et al., 2006; Rauch, 1997; Ruoslahti, 1996). Uma das principais especializações da ME no SNC são as Redes Perineuronais (PNNs), presentes em alguns neurônios, e que foram descritas pela primeira vez por Camillo Golgi, ainda no início do século XIX (Golgi, 1989). As PNNs são compostos agregados de macromoléculas de proteoglicanos (ver Miyata et al., 2005), formadas por proteínas da membrana plasmática associadas à cadeias longas de dissacarídeos (glicosaminoglicanos). A composição das PNNs pode diferir dependendo do tipo neuronal, região cerebral ou mesmo espécie animal a ser considerada (para revisão ver Bandtlow and Zimmermann, 2000). Algumas PNNs são restritas a neurônios

inibitórios imunoreativos à parvalbumina no córtex cerebral de roedores (Celio and Blumcke, 1994; Celio and Chiquet-Ehrismann, 1993; Elston et al., 1999; Viggiano, 2000), enquanto que outras podem ser encontradas em neurônios piramidais no córtex cerebral de marsupiais ou primata (Bruckner et al., 1998; Hausen et al., 1996).

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

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

No presente trabalho utilizam-se as características da distribuição dos terminais de glicosaminoglicanos da matriz extracelular não só como marcador arquitetônico seletivo para a subdivisão do corno de Amon mas também como um indicador de transformações neuropatológicas que afetam as redes perineuronais da matriz associadas à doença neurodegenerativa crônica. Essa escolha se deveu ao fato de que dados da literatura mostram que tanto os neurônios rodeados pela RP quanto a própria rede são afetados na Doença de Alzheimer e na doença príon e que sua integridade é

relevante para preservação dos mecanismos de memória e aprendizado, com papel neuroprotetor contra excitotoxicidade (Okamoto et al., 1994), estresse oxidativo (Morawski et al., 2004) e formação de placas neurofibrilares (Bruckner et al., 1999; Hartig et al., 2001). A perda de redes perineuronais coincide com a ativação microglial e com a redução da plasticidade sináptica (Franklin et al., 2008b). No hipocampo as redes perineuronais são mais abundantes em interneurônios GABAérgicos dentro ou ao redor da camada de células piramidais do próprio hipocampo, subiculum e pré-subiculum, mas também está bastante distribuída difusamente na neuropila na região de transição entre CA2 e seus vizinhos CA1 e CA3 (Bruckner et al., 2003a).

Do lado das projeções aferentes e eferentes, as amino-dextranas biotiniladas (ADB) podem agir como neurotraçador anterógrado ou retrógrado, ou ambos, dependendo do método, do peso molecular e dos tecidos usados, revelando as vias anatômicas e o detalhamento morfológico de neurônios isolados com árvores axonais e dendríticas de alta resolução (Jiang et al., 1993; van Haeften et al., 1995). As amino dextranas são facilmente fixáveis com o glutaraldeído ou o formaldeído devido à presença de um grupo lisina que pode se ligar covalentemente às moléculas vizinhas. Esse traçador de baixo peso molecular (retrógrado) se distingue do de alto peso molecular (anterógrado), por possuir difusão axonal mais rápida e maior preenchimento dos processos celulares periféricos particularmente da árvore dendrítica (Veenman et al., 1992). Por outro lado injeções de amino-dextrana biotinilada (ADB) de 10 Kd de peso molecular, mostram marcação anterógrada extensiva de axônios e terminais com excelente resolução. A ADB é transportada por pelo menos 15-20 milímetros em uma semana. Tempos de sobrevivência mais longos

podem permitir o transporte por distâncias ainda maiores, mas o tempo de sobrevivência mais longo pode contribuir para uma marcação mais bem definida em distâncias mais curtas, presumivelmente devido ao efeito de acumulação do neurotraçador. O transporte de ADB além de rápido não parece sofrer degradação ao longo do tempo e parece ser efetivo para uma grande variedade de sistemas de projeção incluindo aqueles dentro do sistema nervoso central (SNC) empregados no presente trabalho (Reiner et al., 2000).

## 1.5 O MODELO EXPERIMENTAL

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



déficits cognitivos da DA tem sido usados para definir a natureza, a distribuição espacial e a seqüência temporal das alterações celulares, delineando possíveis mecanismos associados às disfunções cerebrais (Yamada and Nabeshima, 2000). A utilização desses modelos para estudos de neurodegeneração crônica na doença prion em particular tem sido freqüente e no camundongo C57Bl6J produziu uma série extensa de trabalhos investigando a neurobiologia da doença prion incluindo aspectos comportamentais e neuropatológicos e.g. (Betmouni et al., 1999; Boche et al., 2006; Broom et al., 2007; Cunningham et al., 2003; Felton et al., 2005; Gray et al., 2006; Perry et al., 2002; Picanco-Diniz et al., 2004). Esses resultados são comparados aos do camundongo albino Suíço no presente trabalho.

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

A razão para a escolha do camundongo Suíço albino está associado ao fato de que nesse modelo foram realizados muitos dos estudos acerca de infecções induzidas por arbovírus a partir de trabalhos anteriores e.g. (Diniz et al., 2006; Diniz et al., 2008; Gomes-Leal et al., 2006), sendo esse um dos fatores de risco que se

investiga presentemente no Lab de Neurodegeneração e infecção em regime de co-infecção com o agente ME7.

Nossa hipótese inicial era de que as áreas alvo das mudanças induzidas pela doença prion nesse modelo seriam as mesmas do modelo C57Bl6J mantendo-se a mesma seqüência temporal e os mesmos danos quantitativos ao longo da progressão da doença. Os resultados neuropatológicos e comportamentais revelaram, entretanto, diferenças importantes entre as duas linhagens principalmente quanto às áreas preferenciais do sistema límbico afetadas no início da doença e ao curso temporal das lesões. Diferente do encontrado na variedade C57Bl6J, o septum e o tálamo foram afetados mais precocemente e com mais intensidade do que a formação hipocampal. Nesse sentido, é interessante mencionar que há evidências em humanos de que a área mais afetada pela doença prion, empregando imunomarcação para a proteína prion, também não é o hipocampo, havendo menores danos hipocampais do que em outras áreas cerebrais (Kaneko et al., 2008).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

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

### **2.2 ESPECÍFICOS**

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

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

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

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)