

Aline Mariana Venancio

**INFECÇÃO BACTERIANA NEONATAL COMO FATOR DE  
RISCO PARA PREDISPOSIÇÃO À DOENÇA DE ALZHEIMER  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PGBCD) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para a obtenção do Grau de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Yara Maria Rauh Müller

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Pinto Figueiredo

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Venancio, Aline Mariana

Infecção bacteriana neonatal como fator de risco para predisposição à doença de Alzheimer em camundongos / Aline Mariana Venancio; orientadora, Yara Maria Rauh Müller - Florianópolis, SC, 2017.

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Alzheimer. 3. Dano Cognitivo. 4. Infecção bacteriana. I. Müller, Yara Maria Rauh. II. Figueiredo, Claudia Pinto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Aline Mariana Venancio

**INFECÇÃO BACTERIANA NEONATAL COMO FATOR DE  
RISCO PARA PREDISPOSIÇÃO À DOENÇA DE ALZHEIMER  
EM CAMUNDONGOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Florianópolis, 5 de julho de 2017.

---

Prof. Geison de Souza Izídio, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Yara Maria Rauh Müller, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)  
Presidente da banca e Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Patrícia Souza Brocardo, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)  
Membro titular

---

Prof.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)  
Membro titular



## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus por esta grande oportunidade de crescimento!

À minha coorientadora e amiga querida, Professora Cláudia Pinto Figueiredo, que compartilhou comigo todo o seu conhecimento desde o início do processo de seleção até o final desta jornada científica. Por toda a sua dedicação, por abrir as portas da sua casa e do Núcleo de Neurociências da Faculdade de Farmácia, onde pude executar meus experimentos. Faltam-me palavras para agradecer essa grande pesquisadora. Tenho grande orgulho por ter sido sua orientanda, pois sem sua presença, participação e dedicação eu não chegaria até aqui!

À Professora Yara Muller, por permitir que eu fizesse parte da equipe do Laboratório de Reprodução Animal, por sua orientação e dedicação.

À professora e amiga Gizelle Fazzioni Passos, pela grande amizade, cumplicidade e dedicação a mim concedidas, na vida e na ciência. Suas contribuições foram sempre válidas em me fazer refletir e nortear meus passos.

À professora Julia Clark, por oportunizar minha participação no projeto de pesquisa que desenvolve, pela atenção, orientação e discussões enriquecedoras que me proporcionaram grande conhecimento.

À Mestranda Paula Frost, pela amizade e parceria neste projeto, por dividir conhecimentos e experimentos, por me substituir nas minhas ausências, por ter contribuído tanto para este trabalho. Agradeço imensamente cada dia de convivência, grandes conversas, cumplicidade e aprendizados adquiridos.

A todos os amigos e colegas do Núcleo de Neurociências da Faculdade de Farmácia, pelo acolhimento, pela convivência, pelas contribuições e colaborações nos meus experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal, especialmente à Thaline Quadros, pela ajuda nas correções e revisões, por seus conselhos e pela dedicação na etapa final deste trabalho.

A todos os professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelos conhecimentos adquiridos. Em especial, às minhas queridas parceiras de seminários: Chirle e Carla. Aprendi muito com vocês duas, estão guardadas em meu coração!

À Joanésia Maria Junkes, coordenadora do Biotério Central onde trabalho, pelo apoio e incentivo de crescimento contínuo e compreensão, permitindo que eu me ausentasse de sua equipe de trabalho para focar na conclusão desta etapa de meu estudo.

E aos colegas de trabalho do Biotério Central, pela compreensão e pela substituição de tarefas que me permitiram dedicação a este trabalho.

Ao professor João Batista Calixto, por me apresentar a carreira científica, por toda experiência e por ter me apresentado a amigos que adquiri ao longo dos 10 anos de trabalho em seu grupo de pesquisa. Considero este o ponto de partida para o encorajamento em busca do crescimento profissional que conquistei hoje.

À minha amada família, meu pai José, minha mãe Francisca e minha irmã Janaina, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo em todos os momentos importantes da minha vida, desde o início de minha formação até o presente. Em especial, ao meu irmão Acil Antônio, em sua memória.

Ao meu namorado André Foletto, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, pelo amor, amizade, companheirismo, parceria e, principalmente, paciência.

Ao amigo Gilmar Stipp, por seu caráter incentivador e consolador, por ter dividido comigo os momentos de dúvida, por sempre acreditar em minhas capacidades. Sem você eu não teria tido coragem suficiente para tentar a prova. És meu exemplo e minha inspiração desde que trabalhamos juntos.

À minha amiga Isabelle Borges, por seus conselhos e orações.

E a tantas outras pessoas, a quem peço desculpas por não terem sido aqui citadas, mas que participaram e contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse executado e para que esta etapa fosse concluída!

Muito obrigada!

Quanto mais nos elevamos, menores parecemos  
aos olhos daqueles que não sabem voar.

Friedrich Nietzsche





## RESUMO

Crescentes evidências sugerem que doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (DA) e Parkinson, podem ter relação com diferentes insultos perinatais. Estudos experimentais mostram que a infecção bacteriana durante o período neonatal pode resultar em prejuízo de aprendizado e de memória em animais na vida adulta. No presente estudo, avaliamos se a infecção neonatal em camundongos aumenta a suscetibilidade dos animais para desenvolver DA na vida adulta, e as possíveis alterações morfológicas envolvidas nesse processo. Como modelo experimental, utilizamos a injeção intracerebroventricular (icv) de oligômeros do peptídeo beta-amiloide (A $\beta$ Os), as principais neurotoxinas presentes no cérebro de pacientes com DA, que resultam em prejuízo cognitivo em camundongos. A infecção neonatal foi induzida pela injeção subcutânea de *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) em animais com quatro dias de vida (P4). Nossos resultados mostram que a injeção icv de uma dose não tóxica de A $\beta$ Os (1 pmol/sítio, icv) para camundongos adultos saudáveis foi capaz de induzir prejuízo cognitivo quando associado a uma infecção bacteriana neonatal. Os resultados das análises imuno-histoquímicas para proliferação neural demonstraram que a infecção neonatal induz à diminuição do número de células em proliferação, positivas para o anticorpo anti-KI67, em todas as regiões hipocâmpais avaliadas (CA1, CA3 e GD), 24 horas após a infecção. O número de progenitores neurais também estava diminuído no hipocampo de animais que receberam injeção de *E. coli* aos 4 dias de vida, conforme demonstrado pela diminuição do número de células positivas para a Nestin. A infecção neonatal mostrou-se eficiente em induzir aumento da morte neuronal na região do GD do hipocampo de camundongos, 24 horas após injeção de *E. coli* subcutânea (P5), conforme observado nas análises histoquímicas de Fluoro-Jade. Também demonstramos que a infecção bacteriana neonatal resulta em aumento no número de células positivas para o marcador neuronal Neu N na região do córtex parietal, quando avaliados em P21, e aumento de imunoreatividade para GFAP na região CA3 do hipocampo, em P14. Finalmente, foi observado que a infecção neonatal resulta em perda sináptica nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de camundongos, conforme demonstrado pela diminuição da expressão da proteína sinaptofisina, tanto em P5 como P14. Em conjunto, esses dados sugerem que alterações celulares durante o período pós-natal, como diminuição de proliferação, aumento de morte neuronal e diminuição de proteína sináptica na região do hipocampo podem contribuir para o aumento da

susceptibilidade de camundongos à toxicidade induzida pelos A $\beta$ O na vida adulta. Nossos achados poderão contribuir para o entendimento de mecanismos que influenciam no aumento do o risco de desenvolvimento da DA.

**Palavras-chave:** Infecção pós-natal. Doença de Alzheimer. Dano cognitivo. *E. coli*. Hipocampo. Marcadores neurais.

## ABSTRACT

Growing evidence suggests that many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's, may be related to different perinatal insults. Experimental studies show that bacterial infection during the neonatal period results in increased susceptibility of animals to cognitive impairment in adult life. In the present study we evaluated whether neonatal infection in mice increases the susceptibility of animals to develop AD in adult life, and the possible morphologic alterations involved in this process. As an experimental model, used the intracerebroventricular (icv) injection of beta-amyloid peptide oligomers (A $\beta$ Os), the major neurotoxins present in the brains of AD patients, resulting in cognitive impairment in mice. Neonatal infection was induced by subcutaneous injection of *E. coli* ( $0.5 \times 10^6$  CFU) in four-day-old animals (P4). Our results show that icv injection of a non-toxic dose of A $\beta$ Os (1 pmol / site, icv) for adult mice was not able to induce cognitive impairment when associated with a neonatal bacterial infection. We demonstrated that neonatal bacterial infection results in an increase in the number of neurons positive for the Neu N neuronal marker in the parietal cortex region, when evaluated in P21, and an increase in GFAP immunoreactivity in the CA3 region of the hippocampus at P14. The results of the immunohistochemical analyzes for neural proliferation demonstrated that neonatal infection induces a decrease in the number of proliferating cells positive for the anti-KI67 antibody in all hippocampal regions evaluated (CA1, CA3, and GD), 24 hours after Infection (P5). The number of neural progenitors was also decreased (P14) in the hippocampus of animals that received *E. coli* injection at 4 days of age, as demonstrated by the decrease in the number of nestin-positive cells. Neonatal infection proved to be efficient in inducing increased neuronal death in the hippocampus GD region of mice, 24 h after injection of subcutaneous *E. coli* (P5), as observed in histochemical analyzes of Fluor-Jade. Finally, we observed that the infection Neonatal infection results in synaptic loss in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus of mice, as demonstrated by decreased expression of the protein synaptophysin in both P5 and P14. Together, these data suggest that cellular changes during the postnatal period, such as decreased proliferation, increased neuronal death, and decreased synaptic protein in the hippocampus region may contribute to increased susceptibility of mice to A $\beta$ -induced toxicity In adult life. Our findings may contribute to the understanding of mechanisms that influence the increase in the risk of developing AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease. Cognitive damage. *E. coli*. Postnatal infection. Hippocampus. Neural markers.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de mecanismos envolvidos no desenvolvimento humano ao longo do tempo .....	22
Figura 2 – Desenho esquemático da BHE.....	24
Figura 3 – Representação esquemática do corte sagital do hipocampo com suas estruturas e camadas celulares.....	29
Figura 4 – Esquema de comparação temporal: Camundongos em relação ao homem .....	33
Figura 5 – Delineamento experimental .....	39
Figura 6 – Secção sagital do hipocampo de neonatos (P21) de camundongos.....	42
Figura 7 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o peso corporal .....	47
Figura 8 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o peso dos cérebros .....	48
Figura 9 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em P90 sobre déficit cognitivo de camundongos no RO .....	49
Figura 10 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o prejuízo cognitivo de camundongos adultos .....	50
Figura 11 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre a capacidade locomotora de camundongos.....	51
Figura 12 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em P90 sobre a espessura da camada de células nas regiões hipocampais de camundongos.....	52
Figura 13 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P5.....	53
Figura 14 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P7.....	54

Figura 15 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P14 .....	55
Figura 16 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P21 .....	56
Figura 17 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos em P5.....	57
Figura 18 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos P7.....	58
Figura 19 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos P14.....	59
Figura 20 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos em P21....	60
Figura 21 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P5 .....	61
Figura 22 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P7 .....	62
Figura 23 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P14.....	63
Figura 24 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P21 .....	64
Figura 25 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o número de células progenitoras neurais no hipocampo de camundongos .....	65
Figura 26 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocampais em P5.....	66
Figura 27 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocampais em P7.....	67
Figura 28 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocampais em P14.....	68
Figura 29 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocampais em P21 .....	69

Figura 30 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos P5..	70
Figura 31 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos em P7....	71
Figura 32 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos em P14..	72
Figura 33 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos em P21..	73
Figura 34 – Quadro-resumo dos resultados.....	74





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
A $\beta$	$\beta$ -amiloide
A $\beta$ O	Oligômeros de $\beta$ -amiloide
APP	Proteína precursora amiloide
ANOVA	Análise de variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro ( <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
BHE	Barreira hematoencefálica
CA	Campo Aberto
CA1	Corno de Amón 1
CA2	Corno de Amón 2
CA3	Corno de Amón 3
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CD11b	Marcador de micróglia $\beta$ interina ( <i><math>\beta</math>-integrin marker of microglia</i> )
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX2	Ciclooxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DBCA	Diretrizes Básicas para Utilização de Animais em Pesquisa Científica e Didática
DO	Densidade Óptica
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FG	Fluoro-Jade
GD	Giro denteado
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia ( <i>glial derived neurotrophic factor</i> )
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HE	Hematoxilina e Eosina
ICV	Intracerebroventricular
IL1	Interleucina 1

IL6	Interleucina 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
Ki67	Proteína nuclear de células em divisão celular
LPS	Lipopolissacarídeo
NGF	Fator de crescimento do nervo ( <i>nerve growth factor</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salino fosfato
PGBCD	Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento
PSEN1	Presilina 1
PSEN2	Presilina 2
P4	Pós-natal 4 dias
P5	Pós-natal 5 dias
P7	Pós-natal 7 dias
P14	Pós-natal 14 dias
P21	Pós-natal 21 dias
RO	Reconhecimento de objetos
SC	Subcutânea
SIP	Sistema imune periférico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TNF	Fator de crescimento tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1. AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	21
1.2. INFLAMAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	23
1.3. INTERAÇÃO ENTRE O SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO E AS DOENÇAS QUE ACOMETEM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.. .....	25
1.4. MÚLTIPLOS EVENTOS INFLAMATÓRIOS.....	26
1.5. HIPOCAMPO E PLASTICIDADE CELULAR.....	27
1.6. DOENÇA DE ALZHEIMER.....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. ANIMAIS.....	37
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
3.3. PREPARO DA SOLUÇÃO BACTERIANA.....	39
3.4. INDUÇÃO DE INFECÇÃO BACTERIANA .....	40
3.5. TESTE DE CAMPO ABERTO .....	40
3.6. TESTE DE RECONHECIMENTO DO OBJETO.....	40
3.7. INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER.....	41
3.8. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO HIPOCAMPO .....	41
3.9. ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DE PLASTICIDADE HIPOCAMPAL.....	42
3.10. ANÁLISE DA NEURODEGENERAÇÃO E MORTE CELULAR. .....	44
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45

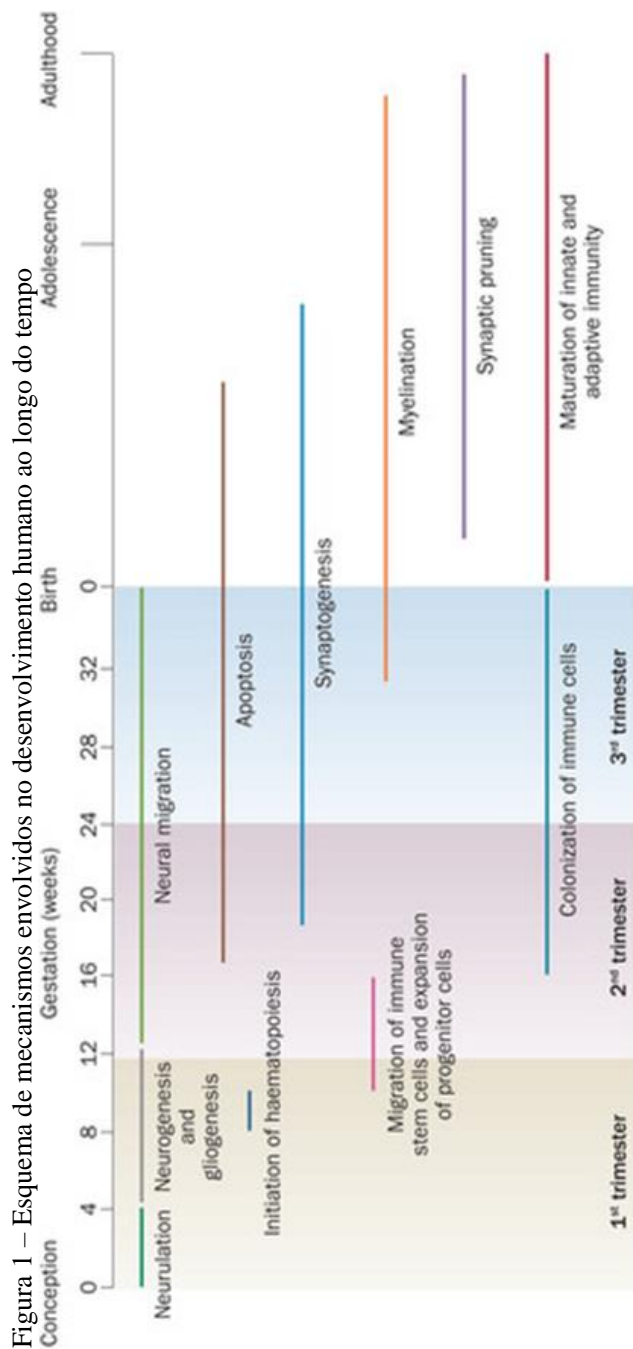
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. A INFECCÃO NEONATAL INDUZ ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS TARDIAS EM CAMUNDONGOS .....	48
4.2. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA NEURONAL E ASTROCITÁRIA DO HIPOCAMPO E CORTEX APÓS INFECCÃO NEONATAL EM CAMUNDONGOS .....	52
4.3. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NO HIPOCAMPO APÓS INFECCÃO NEONATAL EM CAMUNDONGOS .....	60
4.4. QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À INFECCÃO NEONATAL.....	69
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Fatores ambientais podem afetar a forma como as células de um organismo controlam a expressão de seu DNA, de modo que eventos estressores que atuam nos estágios iniciais da vida podem ser os responsáveis pelo surgimento de alterações no comportamento e na fisiologia de um indivíduo. Nesse contexto, infecções de natureza diversa em neonatos foram relacionadas com um maior risco para o surgimento de doenças, como o autismo (MELDRUM et al., 2013; PLETNIKOV et al., 2002) e a esquizofrenia (MARTYN, 1997; LOGROSCINO, 2005; WATANABE et al., 2010; BAHARNOORI et al., 2012; MELDRUM et al., 2013). Outras neuropatologias, como o Alzheimer, de forma semelhante, podem ter relação com a infecção neonatal e o surgimento futuro da doença (LIM et al., 2015), o que torna promissor estudar os mecanismos celulares envolvidos nesse processo durante o desenvolvimento pós-natal.

### 1.1. AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A gênese das células é um mecanismo observado em todos os tecidos que compõem um organismo. No tecido nervoso esse mecanismo é chamado de neurogênese, que compreende uma intensa atividade proliferativa e migratória dos precursores neurais em um processo contínuo, que ocorre a partir do período embrionário e que perdura, em menor intensidade, por toda a vida do indivíduo. A regulação desse processo é fundamental para os organismos adultos, pois é responsável pelo delineamento das células que compõem o tecido nervoso. Processo idêntico ocorre com a gliogênese e seus precursores neurogliais, que ao longo da vida adulta ainda possuem a capacidade de se proliferar (LENT, 2005; BILBO et al., 2009).



Fonte: Retirado do artigo de revisão de Knuesel et al. (2014), publicado na Revista Nature.

O equilíbrio homeostático do sistema nervoso central (SNC) requer um controle do ciclo celular em todas as suas fases, para que ocorra uma adequada divisão celular. Em caso de dano, o tecido nervoso ativa sinalizadores intracelulares e extracelulares que levarão a um possível reparo ou à parada do ciclo e à morte celular programada (FAN et al., 2008).

A programação celular é caracterizada por um conjunto de eventos que ocorrem no período perinatal (pré e pós-natal), os quais podem delinear a forma como esse indivíduo responderá a estímulos durante sua vida (WILLIAMSON et al., 2011). Esse fenômeno demonstra que fatores estressores são capazes de levar a uma maior predisposição para o surgimento de doenças neuropsicológicas (BILBO et al., 2005).

Agentes externos como as infecções bacterianas são capazes de produzir inflamação durante o período pré e pós-natal (BILBO et al., 2009; WILLIAMSON et al., 2011), podendo afetar a formação de células neurais e alterar a sinalização dos processos de diferenciação celular, modificando aspectos importantes como a especificidade de cada camada, bem como o número e a morfologia das células que constituem o tecido. Danos celulares ocasionados por lesões ou patologias levam a uma resposta imunológica local que culmina na ativação da micróglia e dos astrócitos em um processo conhecido como gliose reativa (BILBO et al., 2009). Insultos inflamatórios dessa natureza podem ainda interferir na expressão de proteínas, as quais podem influenciar na proliferação e morte celular neural, interferindo no número ou na estrutura das células, o que poderá levar a disfunção ou comportamento diferente do esperado (FAN et al., 2008).

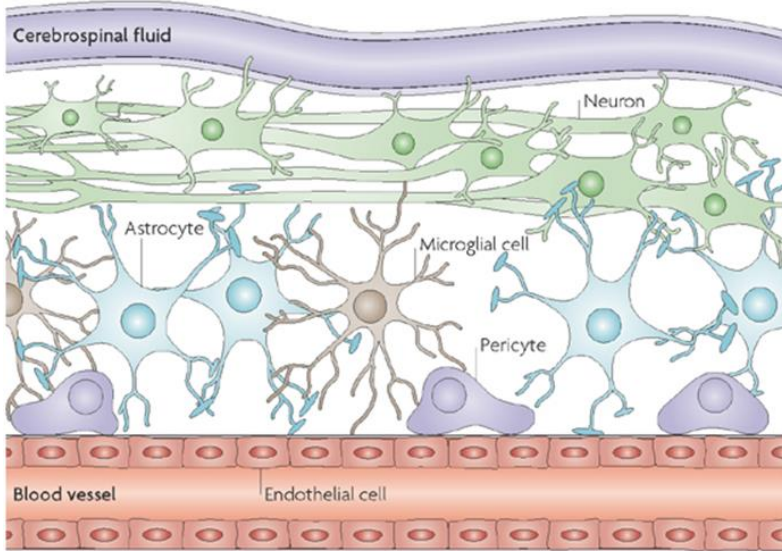
## 1.2. INFLAMAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O processo inflamatório é um importante regulador da homeostase de um indivíduo. Assim, injúrias ou patógenos que venham a causar algum dano são reconhecidos pelo organismo e ativam esse processo, que precisa então ser regulado para que a resposta seja efetivada. Essa regulação envolve a produção de fatores de necrose tumoral (TNF) e citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (IL-1), que sinalizam as células especializadas para que haja migração para o local do insulto e posterior recuperação tecidual (GREEN, 2014).

O SNC é considerado um sistema imunologicamente privilegiado, sendo a neuroinflamação uma resposta inflamatória distinta daquela que ocorre nos tecidos periféricos. Esse sistema difere dos demais órgãos por possuir diversos conjuntos de células especializadas na tarefa imunitária, entre eles a barreira hematoencefálica (BHE), que confere permeabilidade seletiva a microrganismos (PERRY, 2004).

A BHE é composta de células endoteliais vasculares, astrócitos e pericitos circundantes e é capaz de limitar a permeabilidade de alguns mediadores inflamatórios, como citocinas, anticorpos e células imunes periféricas (ENGELHARDT et al., 2009). As células imunes presentes no SNC diferem daquelas presentes no sistema nervoso periférico (SNP), apesar de em determinadas situações haver migração, através de diapedese, de células imunes periféricas para o SNC (ENGELHARDT et al., 2009).

Figura 2 – Desenho esquemático da BHE



Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Retirado do artigo de revisão de Kin et al. (2008), publicado na Revista Nature.



O SNC possui células imunes residentes especializadas, as células da micróglia, que exercem papel fagocítico e são responsáveis por reconhecer e liberar os fatores inflamatórios locais. Essas células produzem tanto fatores anti como pró-inflamatórios, além de fatores neurotróficos, capazes de regular a plasticidade de circuitos neuronais, contribuindo para a proteção e o remodelamento de sinapses. As células microgлияis reconhecem os locais de injúria, sinalizam a migração para o local lesionado, onde pode ser iniciada uma resposta imune inata. Após ser estimulada, seja por um patógeno ou outra molécula, a micróglia modifica sua morfologia ameboide e sintetiza uma série de moléculas intra e extracelulares. Esse processo é conhecido como ativação microglial e é essencial para que o tecido retorne à sua homeostase (HENEKA, 2015).

Outro tipo celular encontrado no SNC, com papel estrutural e imunológico, são os astrócitos, que formam o revestimento do SNC. Essas células aumentam significativamente quando o tecido é exposto a injúrias, em um processo denominado de astrogliose reativa, que por sua vez auxilia na cicatrização da lesão. Os astrócitos também participam da migração dos neurônios durante o desenvolvimento, contribuindo com a funcionalidade sináptica, entre outras interações com células neuronais (SOFRENIW, 2010).

### 1.3. INTERAÇÃO ENTRE O SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO E AS DOENÇAS QUE ACOMETEM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SIP) possuem vias de comunicação para insultos inflamatórios e inflamações periféricas que podem gerar efeitos no SNC, como neuroinflamação ou alteração comportamental (LIEBLEM-BOFF et al., 2013). Uma das vias de comunicação inflamatória entre o SNC e o SIP envolve nervos aferentes, onde, após estes reconhecerem um dano inflamatório, sinaliza regiões específicas do cérebro (DANTZER, 2008).

Uma estrutura bastante estudada para compreender os mecanismos de comunicação entre o SNC e o SIP é a BHE, pois sua permeabilidade seletiva pode ser alterada ao longo da vida (BANKS, 2010). No período perinatal e em algumas situações pró-inflamatórias a permeabilidade da BHE pode ser alterada, permitindo a passagem de

substâncias e/ou microrganismos para o interior do SNC. As células endoteliais da BHE no momento do insulto contribuem para o aumento da permeabilidade nestas situações pró-inflamatórias, secretando citocinas como IL-6 e IL-1 (BANKS, 2010), ou aumentando a expressão de receptores de membrana que podem mediar a passagem de citocinas para o SNC (DANTZER, 2008).

O processo inflamatório induzido por infecções bacterianas em estágios iniciais da vida pode causar uma diminuição no número de células neuronais e o aumento da ativação de células da micróglia, deixando estas últimas mais suscetíveis em responder a um segundo evento inflamatório na vida adulta (WILLIAMSON et al., 2011). Estudos utilizando o lipopolissacarídeo (LPS) como indutor, uma potente endotoxina presente na membrana externa da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) e demais bactérias gram-negativas, mostraram que mesmo em baixas concentrações, foi capaz de provocar ativação microglial em humanos e primatas não humanos quando administrado sistemicamente (BRYDON, 2008). Wang et al. (2013) observaram que a exposição de ratos ao LPS na fase neonatal (P5) foi capaz de causar lesão axonal persistente no hipocampo, levando-os a apresentarem déficits duradouros de aprendizagem.

Outros estudos vêm mostrando a relação entre a inflamação sistêmica nas fases iniciais e suas possíveis consequências a longo prazo na vida dos indivíduos, podendo levar a um aumento do risco de desenvolver doenças como autismo, esquizofrenia, doença de Parkinson e DA (BILBO et al., 2009; BOKSA, 2010; WILLIAMSON et al., 2011; HENEKA et al., 2015).

#### 1.4. MÚLTIPLOS EVENTOS INFLAMATÓRIOS

Estudos mostram que a administração sistêmica de LPS induz em fêmeas prenhas de camundongos uma resposta inflamatória significativa, associada com uma diminuição da neurogênese na prole (CUI et al., 2009). Uma das características relevantes do papel da micróglia em eventos inflamatórios é um fenômeno conhecido como “*priming*”, descrito como a capacidade de responder de maneira aumentada a um estímulo inflamatório quando esse se trata de um segundo evento, que difere de uma resposta desencadeada pela micróglia que não tenha passado por um insulto precedente. O primeiro

estímulo para “*priming*” microglial pode se originar tanto do SNC quanto da periferia, através da comunicação do sistema imune periférico ao SNC, frente uma inflamação aguda. A micróglia em estado de “*priming*” é capaz de desencadear uma maior expressão de marcadores e mediadores inflamatórios, em menor intensidade, para que esta seja ativada e esteja em um estado pró-inflamatório (LULL; BLOCK, 2010) e uma posterior resposta inflamatória, aumentada após ativação imune. O fenômeno de “*priming*” microglial vem sendo relacionado com neuropatologias em estudos que relacionam inflamação e alterações celulares (BILBO et al., 2009; LIEBLEIN-BOFF, 2013; WILLIAMSON et al., 2011).

A prole de fêmeas submetidas a infecção durante a gestação, ao atingirem a idade adulta, apresentam uma resposta inflamatória acentuada, quando comparada com animais não expostos à infecção intrauterina (KNUESEL et al., 2014). Estudos sugerem que a resposta de “*priming*” da micróglia pode ser mais rápida e mais intensa no aspecto secretório, quando comparada com micróglia *nãive*, ou seja, micróglia que ainda não tenham ativação inflamatória (KNUESEL, 2014).

Alterações comportamentais em animais adultos que foram expostos a um insulto infeccioso durante o desenvolvimento intrauterino também foram descritas (PABLOS et al., 2014). Pesquisas apontam para um possível “*priming*” microglial após infecções intrauterinas; contudo, estudos com infecção neonatal ainda são escassos e os possíveis mecanismos envolvidos nesse fenômeno durante o desenvolvimento ainda não estão elucidados (KNUESEL, 2014; LIEBLEIN-BOFF et al., 2013; PABLOS et al., 2014).

## 1.5. HIPOCAMPO E PLASTICIDADE CELULAR

No cérebro, áreas específicas como o córtex e o hipocampo estão diretamente relacionadas aos processos de aprendizagem e memória. Quaisquer alterações fenotípicas ou ocorridas na citoarquitetura dessas áreas podem afetar o comportamento do animal, resultando em prejuízos de aprendizado e memória, ou mesmo comportamentos do tipo depressivo (WANG, 2013).

O hipocampo é uma estrutura central nos mecanismos de memória, tanto de curto como de longo prazo. Ele fica localizado no

lobo temporal, sendo projetado ao ventrículo lateral e à porção interior do corno temporal. Segundo estudos de Lorente de Nó (1934), o hipocampo se divide nas seguintes sub-regiões: Corno de Amón 1 (CA1), Corno de Amón 2 (CA2), Corno de Amón 3 (CA3) e Giro Denteado (GD). Funcionalmente, essas sub-regiões são descritas de acordo com o fluxo de informação que atinge a estrutura (ANDERSEN et al., 2007; LAVENEX; BANTA, 2013). O fluxo e o processamento da informação no hipocampo é iniciado no GD, seguindo para CA3, depois para CA1 e, então, para as regiões adjacentes (LAVENEX; BANTA, 2013).

Anatomicamente, o hipocampo pode ser dividido em camadas de células neuronais, onde se localizam o corpo celular dos neurônios e a região do hilo, esta última rica em prolongamentos celulares, vasos sanguíneos e células gliais. Estudar morfologicamente as células que compõem as regiões do hipocampo, quanto à tipologia, ao número de células, à extensão e à distribuição no tecido podem trazer informações valiosas sobre a plasticidade hipocampal (ANDERSEN, 2007). Tais alterações na morfologia das células e no número de células podem levar a falhas na funcionalidade hipocampal (GREEN; NOLAN, 2014).



O adensamento de células no hipocampo é proporcional à idade do indivíduo, e as células do GD são conhecidas por se relacionarem diretamente com os processos de neurogênese (ALTMAN, 1965; SPALDING et al., 2013). O hipocampo possui uma cascata regulada de eventos celulares capacitados para responder a estímulos inflamatórios (DENG et al., 2010; SAXE et al., 2006; STANGL et al., 2009). Em caso de lesão, o hipocampo é capaz de gerar novos neurônios funcionalmente competentes para o tecido danificado após o insulto. Para que o hipocampo possa coordenar os mecanismos de neurogênese, é necessária uma regulação da citoarquitetura das sub-regiões durante o desenvolvimento (YIRMIYA; GOSHEN, 2011). Essa regulação para neurogênese é controlada pelo GD, formado predominantemente por células granulares, que apresentam capacidade proliferativa durante o desenvolvimento e também na vida adulta (ANDERSEN et al., 2007; LENT, 2005).

No cérebro imaturo, a região hipocampal é mais suscetível em responder a eventos inflamatórios por possuir uma grande densidade de células e mediadores pró-inflamatórios (FRIEDMAN, 2001). Para que ocorra a neurogênese ao longo da vida, o GD necessita manter um nível apropriado de células precursoras. A exposição a fatores estressantes durante as primeiras semanas de vida pode influenciar a maturação do GD, pois interrompe a organização da sua matriz, alterando a estrutura e função hipocampal (LAJUD, 2015). Estudos demonstram que diferentes tipos de agentes estressores podem resultar em uma regulação negativa da expressão de genes associados com a neurogênese adulta, em cérebro de camundongos (FATEMI et al., 2009; GARBETT et al., 2012; OSKVIK et al., 2012).

## 1.6. DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica que tem como principal fator de risco o envelhecimento, sendo responsável pela maioria dos casos de demência em idosos (CASTELLANI et al., 2010). Clinicamente, a DA está relacionada a um severo prejuízo cognitivo, além de alterações neuropsiquiátricas (MCKHANN et al., 1984; WALDEMAR et al., 2007; VAN BEEK; CLAASSEN, 2011). Inicialmente, os pacientes apresentam incapacidade de evocar lembranças recentes, sendo que em estágios mais avançados, os pacientes desenvolvem prejuízo cognitivo severo, confusão mental,

alterações de humor, deficiências na fala e inabilidade motora, evoluindo para o óbito (GREENE et al., 1995). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012), estima-se que mundialmente o número de pessoas afetadas pela doença ultrapasse 35 milhões.

Existem duas formas de manifestação da DA: a forma familiar e a esporádica. A forma familiar corresponde a menos de 5% dos casos da doença e acomete geralmente indivíduos com menos de 55 anos de idade. Essa forma hereditária apresenta mutações autossômicas dominantes em genes que codificam a proteína precursora amiloide (APP), e a presinilina (PSEN1 e PSEN2), ambas proteínas relacionadas com a geração e o metabolismo do peptídeo A $\beta$  (TANZI, 2012). Já a DA esporádica não apresenta alterações genéticas definidas, engloba cerca de 95% dos casos da doença, acometendo geralmente indivíduos com mais de 65 anos de idade (VIOLA et al., 2008; LIN, 2015).

Neuropatologicamente, a DA é caracterizada pela presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares (BU et al., 2014; LIM et al., 2015). O peptídeo  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) é o principal componente das placas senis que se acumulam no cérebro de pacientes portadores da DA, e está associado à neuroinflamação, ao estresse oxidativo e ao prejuízo sináptico (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

A hipótese da cascata amiloide foi proposta na década de 1990, ganhando cada vez mais evidências ao longo dos anos. Ela sugere que o acúmulo do peptídeo A $\beta$  é resultado de uma clivagem anormal da proteína precursora amiloide (APP), presente na membrana da maioria das células (KNOBLOCH et al., 2007), por duas secretases ( $\gamma$ - e  $\beta$ -secretase). A clivagem amiloidogênica da APP resulta na geração de fragmentos de A $\beta$  de tamanhos distintos, com 40 (A $\beta$ 1-40) ou 42 (A $\beta$ 1-42) aminoácidos (AA). Apesar de ambos os fragmentos estarem associados com a sinaptotoxicidade do A $\beta$ , os fragmentos compostos por 42 aa são mais frequentemente presentes no cérebro dos pacientes portadores de DA, sendo capazes de se agregar mais facilmente formando oligômeros solúveis ou agregados insolúveis (KNOBLOCH et al., 2007).

O peptídeo A $\beta$  pode formar monômeros, dímeros e trímeros, denominados arquiteturas “monoméricas” ou “oligoméricas”, ou protofibrilares (estruturas intermediárias entre os agregados oligoméricos e fibrilas) (TABATON et al., 1994). O termo oligômero

caracteriza um amplo grupo de agregados não fibrilares. Estudos recentes demonstraram que os oligômeros de A $\beta$  induzem rapidamente a falha de plasticidade sináptica (WALSH et al., 2002). Por outro lado, estudos com modelos animais evidenciam que a hipótese da forma oligomérica é a que melhor explica a neurotoxicidade do peptídeo A $\beta$  (KNOBLOCH et al., 2007). O peptídeo A $\beta$ 1-42 provoca alterações nos neurônios do córtex e do hipocampo, resultando na indução de déficits cognitivos e mnemônicos, relacionando ou não a morte neuronal. Por sua característica neurotóxica, os oligômeros passaram a ser objeto de estudo, sendo utilizados como indutores de processos envolvendo neuropatologias (WALSH et al., 2002).

Estudos pioneiros estabeleceram um modelo de toxicidade induzida pelos oligômeros do peptídeo A $\beta$  (A $\beta$ O), por meio da injeção dessas espécies no ventrículo lateral de camundongos. Figueiredo et al. (2011) demonstraram que uma única injeção de 10 pmol/sítio de A $\beta$ O intrecerebroventricular (icv) em camundongos adultos é capaz de induzir prejuízos cognitivos na tarefa de reconhecimento de um objeto novo, por um período de, no mínimo, 21 dias. O mesmo estudo demonstrou que uma única injeção de 1 pmol/sítio (icv) não é capaz de induzir prejuízo de memória em camundongos adultos saudáveis.

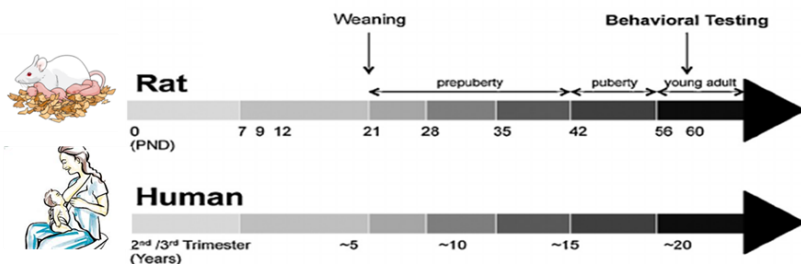
Dessa forma, visando contribuir com os avanços científicos relacionados ao estudo dos eventos que desencadeiam as doenças neurodegenerativas, o presente estudo tem como hipótese que a ocorrência de processos neuroinflamatórios ao longo da vida aumenta a suscetibilidade dos indivíduos para o desenvolvimento da DA na vida adulta. Pretendemos induzir infecção neonatal em camundongos, e desafiá-los com doses não tóxicas de A $\beta$ O na vida adulta, com objetivo de identificar uma possível predisposição destes animais para desenvolvimento da DA. O entendimento dos processos ligados à patologia pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias e possíveis intervenções preventivas e eficazes em impedir o avanço da doença.

Experimentalmente, um modelo animal amplamente estudado em neuropatologias são os camundongos suíços, que possuem metodologias padronizadas para ensaios comportamentais de avaliação da memória e aprendizado. Esse modelo possui facilidade de manejo e cuidado, tempo de vida adequado para estudos envolvendo infecções pós-natais (P),



sendo possível a análise de seus dados em um animal adulto aos 90 dias de vida, aproximadamente, o que valida sua utilização experimental. A revisão bibliográfica de Knuesel et al. (2014) demonstra que os mecanismos que envolvem o início da vida de um ser humano podem ser estudados tomando como modelo os roedores. Estudos comparativos demonstram a temporalidade da vida de um roedor, comparando-a com a de um homem, e torna válidas as avaliações dos mecanismos que envolvem os períodos perinatais e as futuras extrapolações de resultados (TSENG et al., 2009).

Figura 4 – Esquema de comparação temporal: Camundongos em relação ao homem



Fonte: Adaptado de Tseng et al. (2009).

Com base nesse comparativo temporal entre as duas espécies (Figura 4) e verificando os mecanismos a serem avaliados, o presente estudo utilizou modelo de infecção pós-natal aos 4 dias de vida (P4) com ensaios comportamentais na vida adulta dos camundongos aos 90 dias (P90). Optando por coletas de tecidos 24 horas após o insulto, a primeira e segunda semanas após o nascimento são consideradas um período crítico para o desenvolvimento (TSENG et al., 2009).



## 2. OBJETIVOS

Nas seções a seguir serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste estudo.

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é investigar o papel da infecção bacteriana pós-natal, como fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer na vida adulta, utilizando um modelo de injeção intracerebroventricular de oligômeros do peptídeo beta amiloide (A $\beta$ Os) em camundongos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a ação da injeção subcutânea de *E. coli* em neonatos (P4) sobre o comportamento dos camundongos na vida adulta.
- b) Verificar se a infecção bacteriana pós-natal interfere na massa corporal e no peso dos cérebros de camundongos nas idades P5, P7, P14 e P21.
- c) Avaliar a morfometria das regiões hipocâmpais em P5, P7, P14 e P21 de animais submetidos à infecção pós-natal.
- d) Avaliar em P5, P7, P14 e P21 se a infecção neonatal bacteriana induz alterações nos processos de proliferação celular e morte celular.
- e) Verificar se a infecção neonatal bacteriana induz alterações na plasticidade hipocâmpal e sináptica em P5, P7, P14 e P21.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nas seções seguintes serão detalhados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa.

#### 3.1. ANIMAIS

Camundongos suíços machos e fêmeas, cedidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) foram alojados em microisoladores no Biotério de Experimentação Animal e mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam dieta (ração) padrão e água *ad libitum*.

A utilização de animais segue preceitos éticos, conforme aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-8, número de referência 049/14. Seguindo as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do NIH dos Estados Unidos da América (Publicação do NIH nº 85-23, revisado em 1996), e Diretrizes Básicas para Utilização de Animais em Pesquisa Científica e Didática (DBCA), regulamentada no ano de 2014 e editada no ano de 2016.

#### 3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados experimentos-piloto para a definição de uma dose que, após contrair infecção aos 4 dias de vida, não causasse prejuízo cognitivo, para isso foram infectados animais com as doses de 0,25, 0,5 e  $1 \times 10^6$  UFC de *E. Coli*. A escolha da dose de 0.5 foi realizada após testes comportamentais de reconhecimento de objetos (RO) e Campo aberto (CA). Experimentos subsequentes foram realizados com animais com 4 dias de vida que foram distribuídos em dois grupos experimentais:

- **Conjunto experimental 1:** Avaliação morfométrica e morfológica.

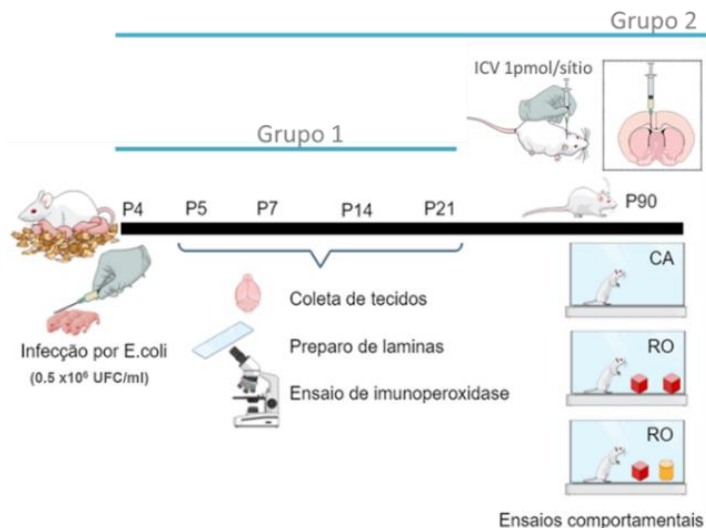
Os animais em P4 foram tratados com injeção de *E. coli* na dose de  $0,5 \times 10^6$  UFC e com tampão salino fosfato (PBS) via subcutânea e analisados 1, 3, 10 e 17 dias após os tratamentos, o que corresponde aos dias P5, P7, P14 e P21 após o nascimento. A pesagem corporal e do cérebro foi realizada para cada grupo experimental. Os cérebros foram processados para as análises morfológicas ( $n = 5$  animais/ 4 grupos/tratamento).

**- Conjunto experimental 2: Avaliação comportamental.**

Os animais em P4 foram tratados com injeção de *E. coli* nas diferentes doses de 0,25, 0,5 e  $1,0 \times 10^6$  Unidades formadoras de colônia (UFC) e com PBS por via subcutânea, além de analisados 86 dias após os tratamentos, o que corresponde ao dia P90 após o nascimento. Em seguida, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (CA) e ao reconhecimento de objetos (RO). Logo após, os animais tratados anteriormente com PBS receberam injeções intracerebroventricular (icv) de A $\beta$ O nas doses 1 e 10 pmol/sítio, já os animais infectados com *E. coli*, receberam somente a injeção icv de A $\beta$ O na dose de 1 pmol/sítio. Os animais foram submetidos novamente aos testes comportamentais. ( $n = 10$  animais/grupo/tratamento)

A seguir, na Figura 5, o esquema geral do delineamento experimental é representado.

Figura 5 – Delineamento experimental



Protocolo de infecção pós-natal (*E. coli*  $0.5 \times 10^6$  UFC/ml, sc) dos grupos analisados. Conforme mostra a Figura 5, o Grupo 1 compreende a análise morfológica no período pós-natal (P5, P7, P14, P21); e o Grupo 2, a análise comportamental após indução de neurotoxicidade (A $\beta$ Os 1 pmol/sítio) na vida adulta (P90).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

### 3.3. PREPARO DA SOLUÇÃO BACTERIANA

A cepa da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* ACTT 25922 na concentração de  $8,54 \times 10^8$  UFC foi preparada em meio BHI – *Brain Heart Infusion* (marca BD) na proporção de 1:10 (200  $\mu$ l da alíquota em 200 ml de meio). O crescimento foi realizado sob agitação orbital à temperatura de 37°C por 16 horas. Para avaliação do crescimento, retirou-se 1 ml da preparação para leitura de absorbância em espectrofotometria, com comprimento de onda de 650 nm. O resultado obtido após a leitura foi considerado como padrão para a diluição da bactéria na dose de  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia. A solução contendo 200  $\mu$ l da bactéria em meio de cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 20°C, sendo o sobrenadante

descartado e o restante suspenso em tampão fosfato na quantidade necessária para atingir a concentração desejada.

### 3.4. INDUÇÃO DE INFEÇÃO BACTERIANA

Camundongos machos e fêmeas neonatos de 4 dias de vida (P4) receberam injeção subcutânea de 50 µl de solução contendo  $0.5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia da bactéria (UFC) *E. coli* ou veículo. Durante o período de aleitamento, 21 dias, foram acompanhados: (a) a eficiência do período de amamentação, (b) o crescimento e peso, e (c) o tempo adequado para o desmame bem como as condições fundamentais para a utilização desses animais nos experimentos.

Quando os animais machos atingiram a idade de 90 dias, foram realizadas as análises comportamentais.

### 3.5. TESTE DE CAMPO ABERTO

O teste comportamental de campo aberto foi utilizado para medir respostas comportamentais, tais como a atividade locomotora, hiperatividade e comportamentos exploratórios (TREMML et al., 1997). Individualmente, os animais foram colocados no centro da arena e deixados para que explorassem livremente os quadrantes, sendo registrado o seu comportamento durante cinco minutos. Após cada sessão, a arena foi limpa com uma solução de etanol 70%, a fim de minimizar as pistas de odor deixadas pelo animal anterior. Os parâmetros comportamentais analisados foram: distância total percorrida (m), velocidade (m/s), número de cruzamentos e tempo de permanência na plataforma central. Os parâmetros foram avaliados no programa *Any-maze* que consiste em um sistema de monitoramento de vídeo automatizado, ligado a um *software* que permite ao experimentador quantificar parâmetros comportamentais. Para cada grupo experimental, foi realizado o teste com 10 animais por grupo (individualmente).

### 3.6. TESTE DE RECONHECIMENTO DO OBJETO

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, dependem um tempo maior para explorar o objeto novo. Esse comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objeto (ENNACEUR; DELACOUR, 1988), o qual vem sendo amplamente



utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (MOSES; BALDWIN, 2005). Os animais foram individualmente colocados em um aparato de campo aberto contendo dois objetos diferentes (A e B), sendo-lhes permitido explorá-los livremente durante 5 min. A sessão de teste foi realizada entre 1-2 horas após a sessão de treino. Durante o teste, os animais foram reintroduzidos individualmente no aparato de campo aberto e mantidos por 5 min, sendo que alguns dos objetos apresentados durante o treino foram aleatoriamente substituídos por um objeto novo (B foi substituído por C). O tempo gasto explorando cada objeto foi medido e expresso como percentagem do tempo total de exploração. Para esse teste, foram utilizados o mínimo de 12 animais por grupo.

Os comportamentos CA e RO foram realizados quando os indivíduos completaram 90 dias e repetidos após a indução do Alzheimer.

### 3.7. INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER

O desafio com oligômeros foi realizado 86 dias após a injeção de bactérias ou veículo em P4. Os animais foram anestesiados e, com uma agulha de 26 gauges e 3 mm de comprimento, acoplada à uma microseringa (10  $\mu$ l; Hamilton, Reno, NV, USA), inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio equidistante entre os olhos, a uma distância igual entre os olhos e as orelhas, perpendicular ao plano do crânio dos animais, em um volume de 3  $\mu$ l da solução contendo A $\beta$ O. Os animais foram expostos à injeção icv de 1 pmol de A $\beta$ O, sendo que um grupo controle recebeu 10 pmol de A $\beta$ O, dose reconhecidamente neurotóxica (FIGUEIREDO et al., 2011).

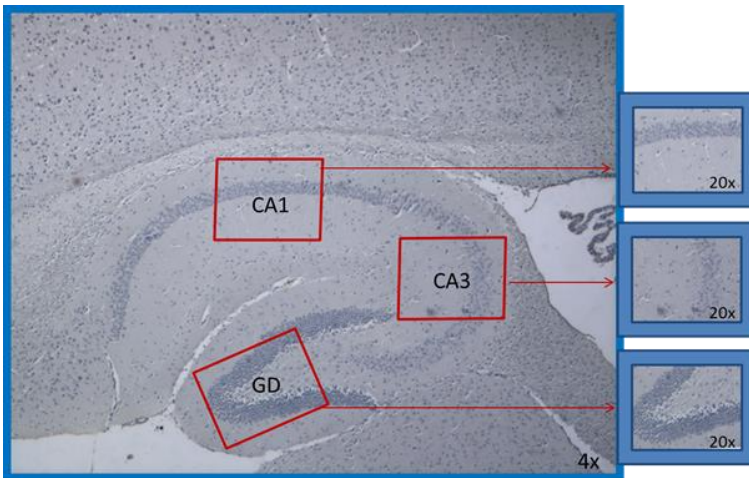
### 3.8. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO HIPOCAMPO

Conforme descrito anteriormente, animais neonatos (P4) foram submetidos à injeção subcutânea de *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) ou veículo (PBS) e eutanasiados por deslocamento cervical em P5, P7, P14 e P21, sendo os cérebros removidos para análise histológica. Após a remoção, os cérebros foram pesados e posteriormente fixados em paraformoldeído 4% durante 24 horas e incluídos em parafina. As amostras foram

seccionadas no plano sagital (4  $\mu$ m). De cada cérebro, foram obtidos de 10-15 cortes, dispostos em 5 lâminas.

A análise morfométrica foi realizada em uma lâmina de cada animal, sendo avaliada a espessura das camadas de células das principais regiões hipocâmpais (CA1, CA3 e GD) (ANDERSEN et al., 2007). Foi realizada a captura de imagens correspondentes às regiões hipocâmpais, sendo as medidas realizadas com auxílio de uma lâmina micrométrica, obtida nas mesmas condições ópticas da aquisição das imagens histológicas (aumento 20x). Foram aferidas duas regiões de cada região hipocâmpal, sendo a média representada nos gráficos. Nas áreas do hipocampo que foram realizadas as análises, conforme representado na Figura 6.

Figura 6 – Secção sagital do hipocampo de neonatos (P21) de camundongos



Hipocampo organizado em camadas: Corno de Amón (CA1), Corno de Amón 3 (CA3), giro denteado (GD). Coloração HE. Aumento 20x.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

### 3.9. ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DE PLASTICIDADE HIPOCAMPAL

Foram realizadas análises imuno-histoquímicas para diferentes marcadores relacionados com parâmetros de plasticidade e/ou

morfologia hipocampal, sendo: proteína nuclear específica para neurônio (anti-Neu N- marca Chemicon), proteína glial ácida fibrilar (anti-GFAP, *glial fibrillary acidic protein*, marca Dako), proteína do filamento intermediário do tipo VI (anti-Nestin, acrônimo para *neuroectodermal stem cell marker*, marca Millipore ), antígeno KI-67 proteína nuclear de células em divisão, usado para avaliação de proliferação celular (anti-KI-67, Abcam), e proteína de vesícula pré-sináptica utilizada como marcador de dano sináptico (anti-sinaptofisina, marca Vector). Secções histológicas foram aderidas em lâminas carregadas positivamente. Após fixação, durante 1 hora em estufa, com temperatura de aproximadamente 60°C, os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados por passagens sucessivas em concentrações decrescentes de etanol.

Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos, pela imersão das lâminas em uma solução de peróxido de hidrogênio 3%. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para tal, as lâminas foram imersas durante 30-40 min em uma solução de tampão citrato 0,01 M, pH 6,0, a uma temperatura de 95-98°C. A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes e as lâminas mantidas em câmara úmida à temperatura de 2-8°C, durante 12-16 horas.

A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente e foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com um polímero de peroxidase (Dako Cytomation) em câmara úmida durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, em temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas à revelação colorimétrica com solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-*tetraaminobiphenyltetrahydrochloride*; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e 0,3% de peróxido de hidrogênio, seguido de contra-coloração em solução de Hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha), desidratação através de passagem das lâminas em etanol, diafanização em xilol e montagem em meio permanente Entellan® (Merck, São Paulo, SP, Brasil).

Para cada reação foi utilizado um controle negativo, com abolição do anticorpo primário nas reações. Os resultados foram alcançados através de uma câmera digital (Sight DS-5ML1), acoplada a um microscópio de luz Eclipse 50i (Nikon, Melville, NY, EUA). Para análise da imunomarcagem para os anticorpos GFAP e sinaptofisina, foram digitalizadas de quatro a cinco imagens a partir dos cortes histológicos sagitais da região hipocampal. Utilizando o programa de análise de imagem NIH ImageJ 1.36b, foi obtido o melhor *threshold* que discriminasse a imunopositividade (coloração castanha). O resultado foi expresso como unidade arbitrária de densidade óptica (D.O.). Para avaliação dos cortes submetidos à reação de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-KI-67, anti-Nestin, anti-Neu N, foram realizadas contagens de células positivas nas diferentes regiões hipocampais (CA1, CA3, GD ou hilo).

A escolha das áreas a serem analisadas foi estabelecida de acordo com o padrão de marcação dos anticorpos nas diferentes regiões hipocampais. Considerando que o córtex também é uma estrutura envolvida nos mecanismos mnemônicos, foram obtidas duas imagens de cada corte imunomarcado para Neu N, de cada animal, para avaliação da densidade neuronal no córtex parietal dos camundongos. As imagens foram analisadas e fotografadas posteriormente no aumento de 20x. Os grupos experimentais foram compostos por 5 animais de cada grupo, com exceção do Grupo PBS P5, que contou com apenas 3 animais para todas as análises avaliadas.

### 3.10. ANÁLISE DA NEURODEGENERAÇÃO E MORTE CELULAR

Foi realizada pela coloração de Fluoro-Jade em hipocampus de animais coletados aos 5, 7, 14 e 21 dias após indução da infecção pós-natal aos 4 dias de vida. Os cortes foram desparafinados e reidratados, conforme descrito para a técnica de imuno-histoquímica (item 3.2.3), e seguido de imersão em água destilada por 3 minutos. As lâminas foram incubadas em uma solução de Fluoro-Jade 0,01% (solução de trabalho), durante 30 minutos. A seguir, lavadas três vezes em água destilada e secas em temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram cobertas com meio de montagem D.P.X. (Aldrich Chem. Co. Milwaukee, WI, EUA) e lamínulas de vidro. Os cortes visualizados em microscópio óptico (Eclipse 50i; Nikon, Melville, NY, EUA), com sistema de análise de fluorescência em campo escuro (filtro B-2A para FITC, banda de

excitação 450-490 nm) para identificação dos neurônios fluorescentes positivos para Fluoro-Jade. Os grupos experimentais foram compostos por 3 animais por grupo.

### 3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio do Programa Graphpad Prism, utilizando *teste t Student* para os resultados obtidos da imunohistoquímica e Anova nos testes comportamentais e avaliações de massa corporal e peso dos cérebros, com valores fixos em 50%. Os dados foram representados pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), sendo que a probabilidade de  $P \leq 0,05$  e  $P \leq 0,01$  foram consideradas como diferenças estatísticas significativas.

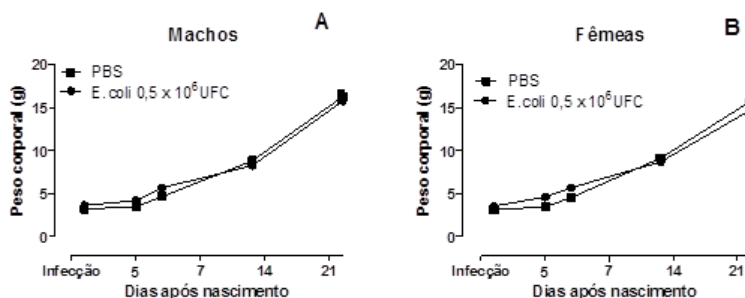


## 4. RESULTADOS

Todos os animais apresentaram o período de aleitamento de 21 dias, com tamanho, peso e aparência considerados normais para sua utilização nos experimentos. Os resultados foram obtidos após avaliações por observações macroscópicas e referem-se à eficiência do período de amamentação, crescimento e peso do animal e tempo adequado para o desmame.

O peso corporal e cerebral dos animais que receberam injeção subcutânea de *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) foi avaliado durante 21 dias, até o desmame da prole. Tanto os machos como as fêmeas que receberam injeção subcutânea de *E. coli* não apresentaram perda de peso corporal ou mesmo retardo no ganho de peso durante o período de 21 dias após o nascimento (Figura 7). Além disso, os pesos médios do cérebro dos camundongos, tanto machos como fêmeas, não apresentaram alteração no grupo que foi submetido à infecção pós-natal (Figura 8).

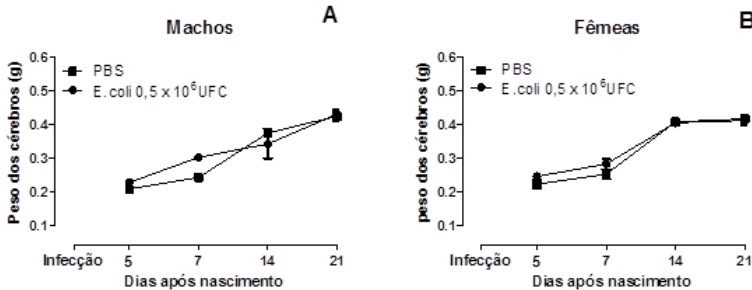
Figura 7 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o peso corporal



Na Figura 7 estão representados os animais submetidos à injeção subcutânea e *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) ou PBS. Os gráficos representam a média ( $\pm$  E.P.M) da massa corporal dos camundongos machos (A) e fêmeas (B) até o desmame (Anova) ( $n = 7$  animais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 8 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o peso dos cérebros



Na Figura 8 estão representados os animais submetidos à injeção subcutânea e *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) ou PBS. Os gráficos representam também a média ( $\pm$  E.P.M) do peso total dos cérebros dos camundongos machos (A) e fêmeas (B) até o desmame ( $n = 7$  animais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.1. A INFECÇÃO NEONATAL INDUZ ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS TARDIAS EM CAMUNDONGOS

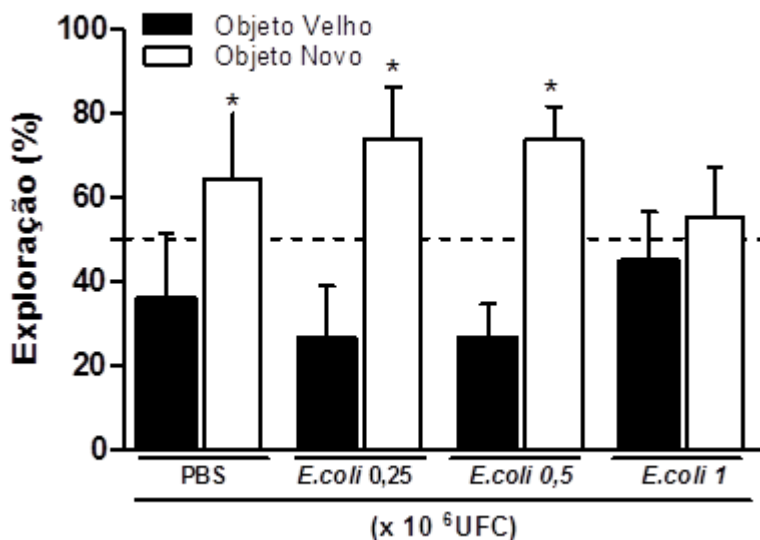
Os animais que receberam injeção subcutânea (sc) da maior dose de *E. coli* ( $1 \times 10^6$  UFC) aos 4 dias de vida (P4) (Figura 9), quando avaliados na tarefa de reconhecimento de novos objetos, apresentaram prejuízo cognitivo na vida adulta. Em contrapartida, os animais infectados com as doses menores de *E. coli* ( $0,25$  ou  $0,5 \times 10^6$  UFC, sc) em P4, apresentaram memória intacta, quando avaliados nessa mesma tarefa na vida adulta. Nenhum grupo de animais apresentou alteração da locomoção quando avaliado no teste de campo aberto.

Na sequência, será avaliado se os animais submetidos à infecção bacteriana com a menor dose de *E. coli*, aos 4 dias de vida (P4), apresentavam alterações comportamentais depois de expostos a um segundo insulto neurotóxico. A Figura 9 demonstra que os animais infectados com *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) em P4, e que receberam injeção icv de A $\beta$ O na vida adulta, quando submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (Figura 9), apresentaram um evidente prejuízo cognitivo, quando associada à indução por oligômeros. O prejuízo cognitivo pode ser observado também nos grupos de animais com controle negativo (10 pmol) e nos animais tratados com *E. coli* na



dose de  $1 \times 10^6$  UFC. É importante ressaltar que nenhum grupo experimental, nem mesmo os animais infectados com  $0,5 \times 10^6$  UFC de *E. coli* no período neonatal, apresentaram prejuízo na exploração ou locomoção na vida adulta, quando avaliados no teste de campo aberto (Figura 10).

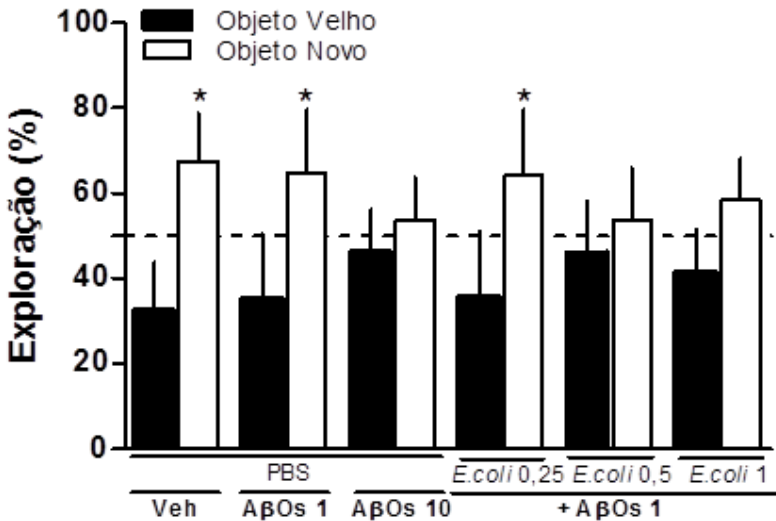
Figura 9 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em P90 sobre déficit cognitivo de camundongos no RO



Na Figura 9 estão representados os animais submetidos à injeção subcutânea e *E. coli* nas doses de 0,25, 0,5 e  $1,0 \times 10^6$  UFC ou PBS em P4. O gráfico representa a porcentagem de exploração dos objetos após treino de habituação, além de dados representados em média ( $\pm$  E.P.M.) e diferenças significativas na porcentagem de exploração dos objetos, em relação ao controle \* $P < 0,05$  (*teste t-student*, com valor fixo de 50%) ( $n = 10$  animais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

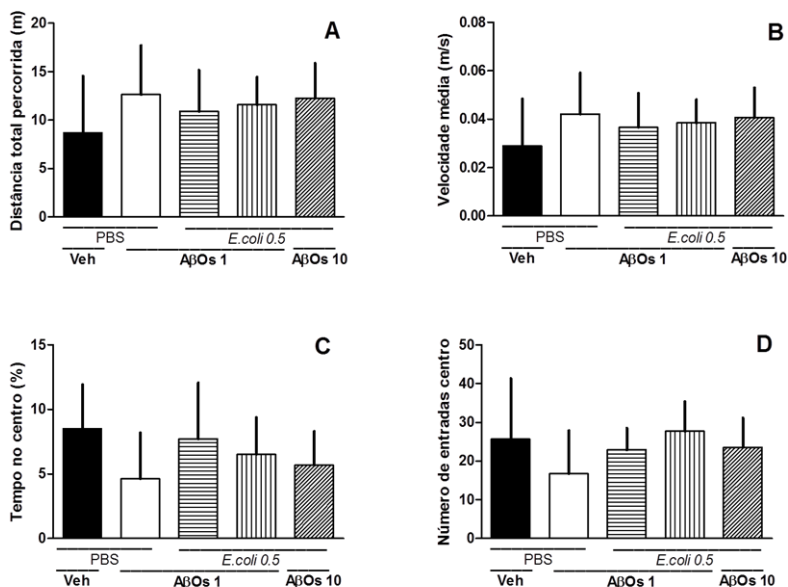
Figura 10 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o prejuízo cognitivo de camundongos adultos



Na Figura 10 são representados animais submetidos à injeção subcutânea e *E. coli* nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 x 10<sup>6</sup> UFC ou PBS em P4, e desafiados com uma injeção intracerebroventricular de 1 pmol/sítio de oligômeros do peptídeo beta-amiloide (AβO) em P90. Além disso, também são representados o grupo de controle negativo, com injeção de 10 pmol/sítio de AβO e as diferenças significativas na média (± E.P.M) de porcentagem de exploração dos objetos, em relação ao controle \*P<0.05 (*test t-student*, com valor fixo de 50%) (n = 10 animais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 11 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre a capacidade locomotora de camundongos



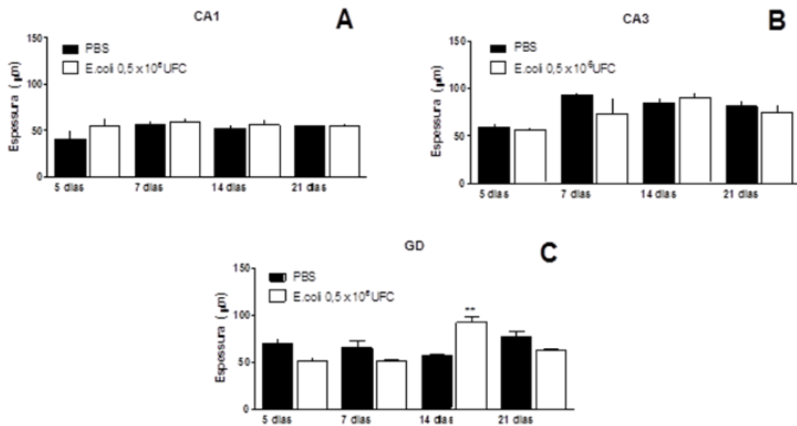
Na Figura 11 são representados os animais submetidos à injeção subcutânea de *E. coli* ( $0,5 \times 10^{-6}$  UFC ou PBS), os quais foram desafiados com uma injeção intracerebroventricular de 1 pmol/sítio de oligômeros do peptídeo beta-amiloide ( $A\beta O$ ). O grupo de controle negativo recebeu  $A\beta O$  (10 pmol/sítio, icv). Nesse sentido, os gráficos representam a distância percorrida (A), a velocidade média (B), o tempo de permanência no centro (C), além do número de entradas no centro do aparato de campo aberto (D). Os dados representam a média ( $\pm$  E.P.M) ( $n = 10$  animais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA NEURONAL E ASTROCITÁRIA DO HIPOCAMPO E CORTEX APÓS INFECÇÃO NEONATAL EM CAMUNDONGOS

A espessura das camadas celulares em micrômetros, que compõem as regiões CA1, CA3 e GD do hipocampo, está apresentada na Figura 12. Os resultados mostram que os animais que receberam injeção de *E. coli* apresentam uma maior espessura da camada de células granulares somente na região do GD, 14 dias após o nascimento, quando comparado com o grupo de animais controle. Nas demais regiões e nos outros períodos experimentais não foi observada diferença significativa na espessura das camadas celulares avaliadas.

Figura 12 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em P90 sobre a espessura da camada de células nas regiões hipocâmpais de camundongos

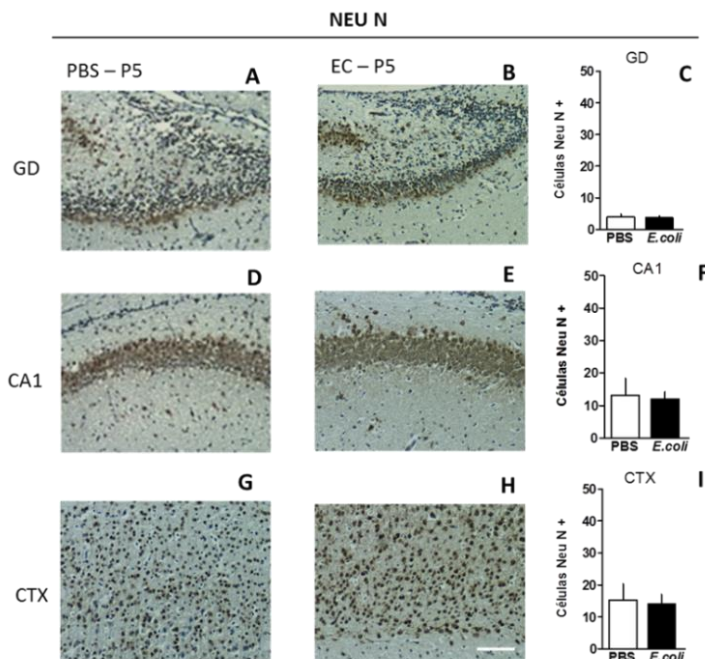


Na Figura 12 são representados os animais submetidos à injeção subcutânea e *E. coli* na dose de  $0,5 \times 10^6$  UFC ou PBS. Os gráficos representam a média ( $\pm$  EPM) da espessura da camada de células na região CA1 (A), CA3 (B) e giro denteado (GD) (C) do hipocampo dos animais em P5, P7, P14 e P21, além de diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$  e \*  $P < 0,05$  (Anova) ( $n = 3$  animais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

As células imunomarcadas com Neu N quantificaram o número de neurônios nas regiões do hipocampo (GD e CA1) e córtex parietal (CTX). Os animais submetidos à infecção bacteriana neonatal e analisados em P5, P7 e P14 não apresentaram diferença no número de células positivas para Neu N quando comparados com grupo controle (Figura 13, Figura 14 e Figura 15). Já nos animais analisados em P21, um aumento significativo no número de células Neu N-positivas foi observado na região do CTX após a infecção bacteriana neonatal (Figura 16).

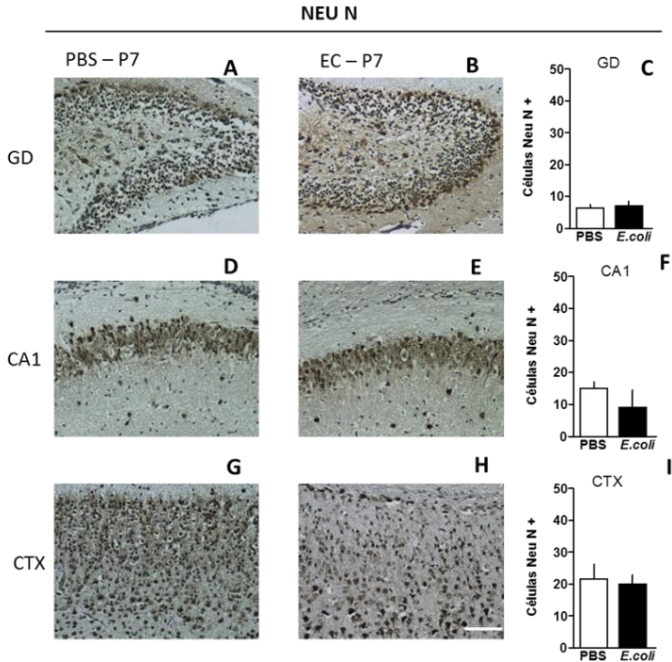
Figura 13 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P5



Na Figura 13 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo em GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), e as da região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E), além de células imunomarcadas na região do CTX expostas ao PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Neu N (C, F, I), os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25 $\mu$ m. (n = 3 a 5 animais/; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

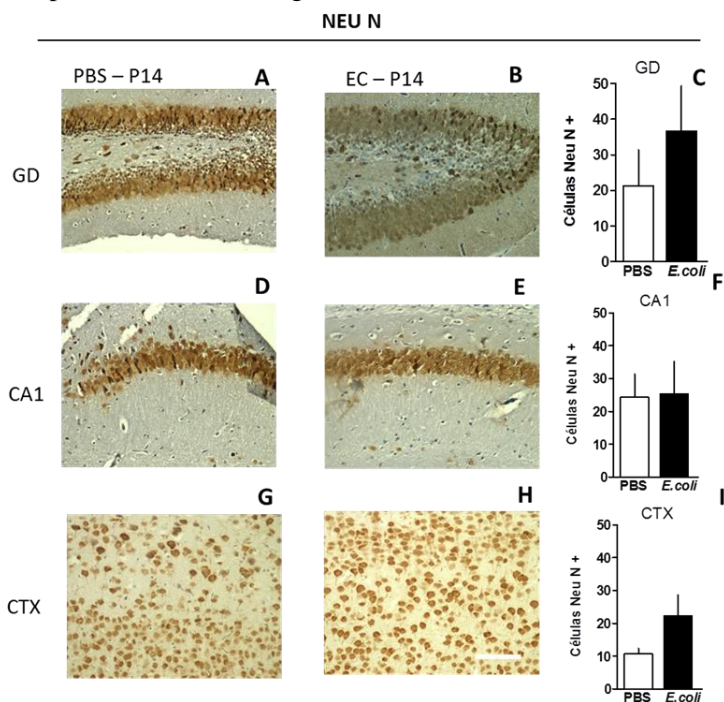
Figura 14 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P7



Na Figura 14 são representadas células imunomarcadas nas regiões do hipocampo em GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), e região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E), além de células imunomarcadas na região do CTX expostas ao PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Neu N (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25 $\mu$ m (n = 5 animais; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

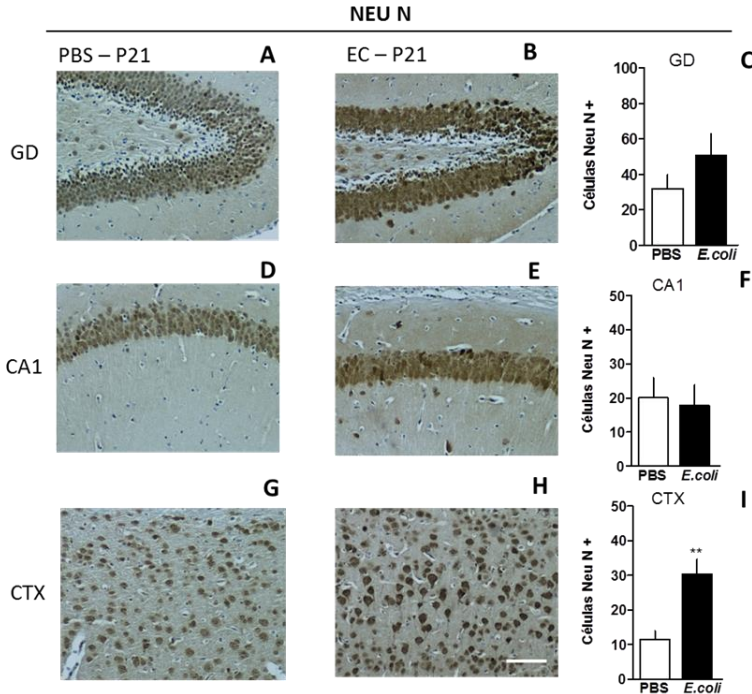
Figura 15 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P14



Na Figura 15 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo em GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), e região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E), além das células imunomarcadas na região do CTX expostas ao PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Neu N (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 16 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Neu N em células do hipocampo e córtex parietal de camundongos em P21



Na Figura 16 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo em GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), e região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E), além das células imunomarcadas na região do CTX expostas ao PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Neu N (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

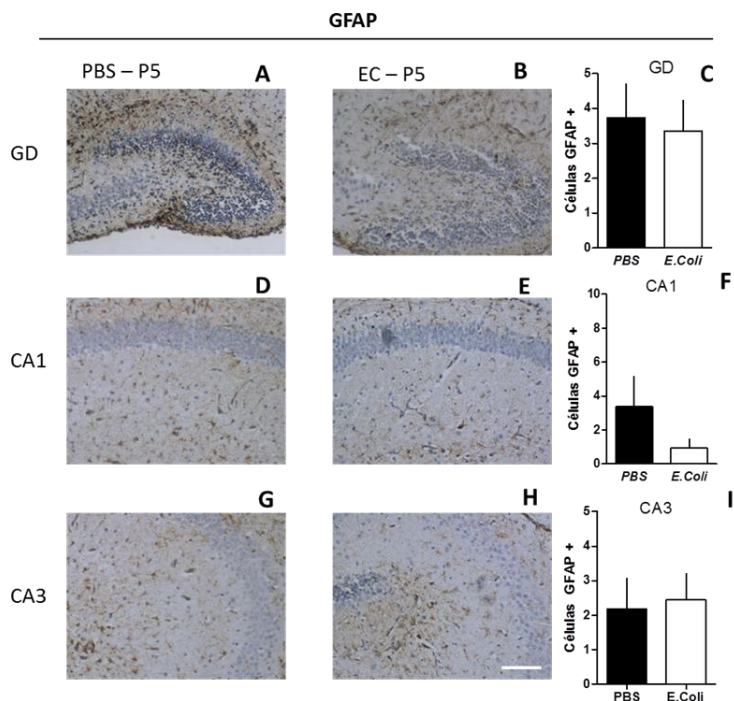
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

A avaliação da astrocitose das regiões do hipocampo marcadas por células GFAP-positivas analisadas em P5, P7 e P21 após a infecção bacteriana neonatal não demonstraram diferenças na intensidade de marcação, quando comparadas com o grupo controle (Figura 17, Figura 18 e Figura 20). Em contrapartida, os animais infectados no período



neonatal e analisados em P14 apresentaram um aumento da expressão de GFAP na região CA3 do hipocampo, quando comparados com o grupo controle (Figura 19).

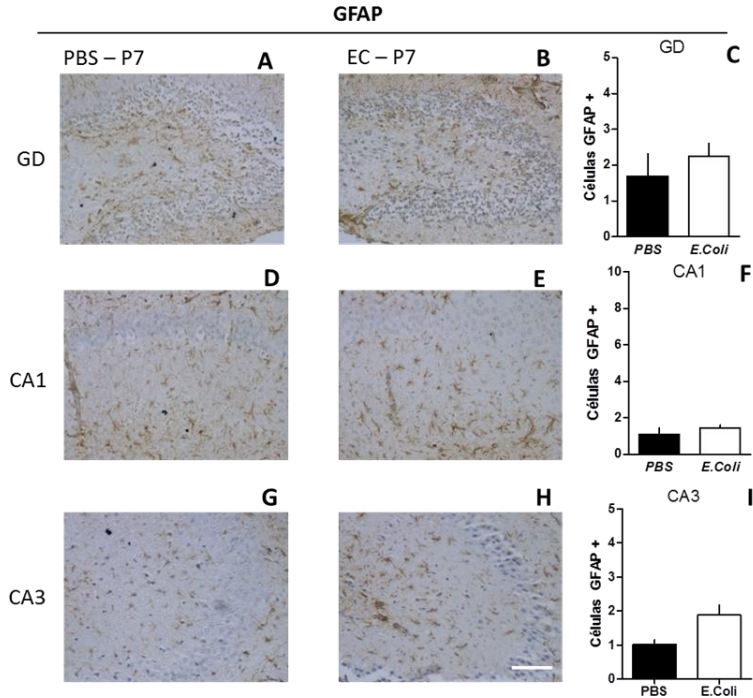
Figura 17 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos em P5



Na Figura 17 são representadas células imunomarcadas nas regiões do hipocampo na região GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para GFAP (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m, (n = 3, 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

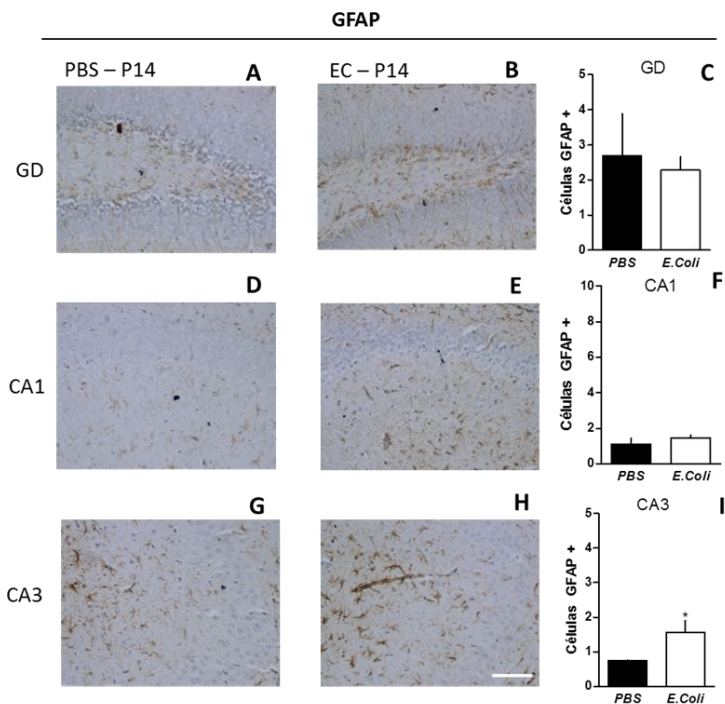
Figura 18 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos P7



Na Figura 18 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo na região GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para GFAP (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m, (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

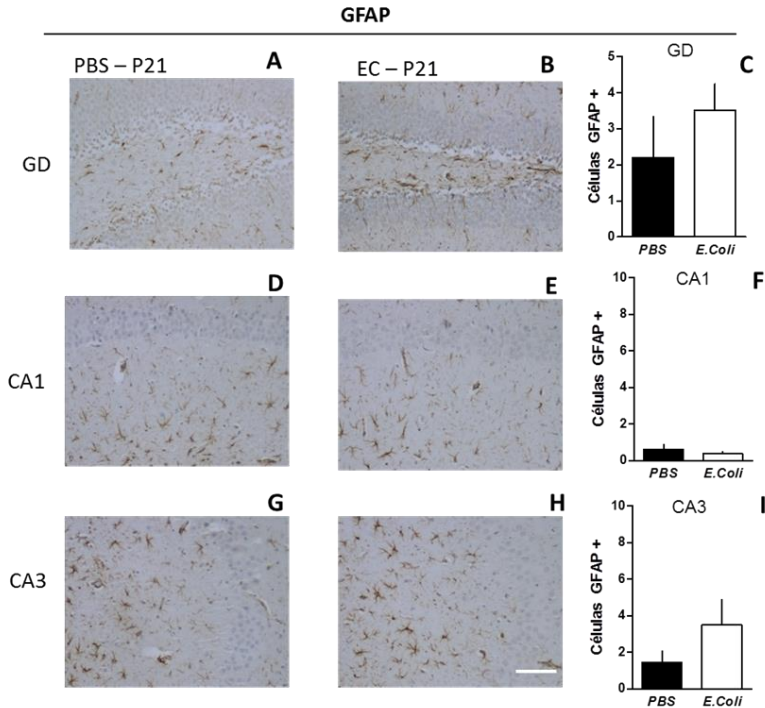
Figura 19 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos P14



Na Figura 19 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo na região GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para GFAP (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*  $P < 0.05$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 20 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína GFAP em células do hipocampo de camundongos em P21



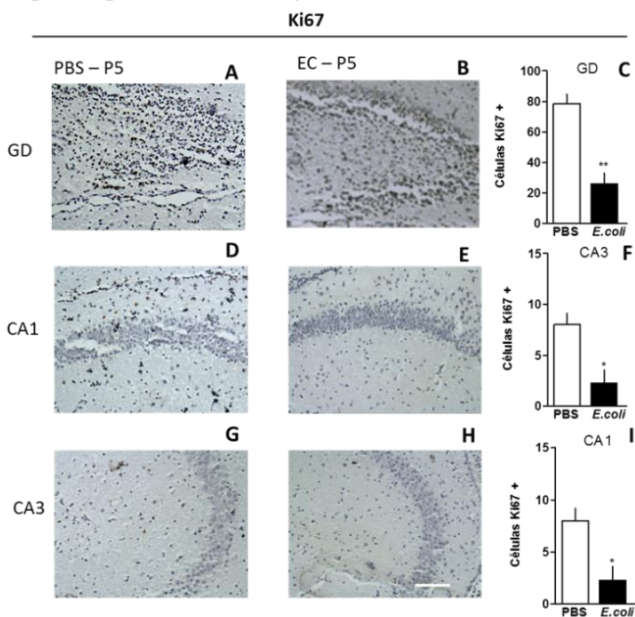
Na Figura 20 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo na região GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para GFAP (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m, (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR NO HIPOCAMPO APÓS INFECÇÃO NEONATAL EM CAMUNDONGOS

A atividade mitótica das regiões do hipocampo foi quantificada pelo marcador Ki67, e os resultados mostram que as células Ki-67-positivas analisadas em P14 e P21, após a infecção bacteriana pós-natal, não apresentaram diferenças no número de células marcadas, quando comparadas com o grupo controle (Figura 23 e Figura 24). Em contrapartida, os animais infectados no período neonatal e analisados em P5 apresentaram uma diminuição da expressão de Ki-67 em todas as regiões do hipocampo, quando comparados com o grupo controle (Figura 21). A diminuição da expressão dessa proteína pode ser observada em P7 na região do GD (Figura 22).

Figura 21 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P5

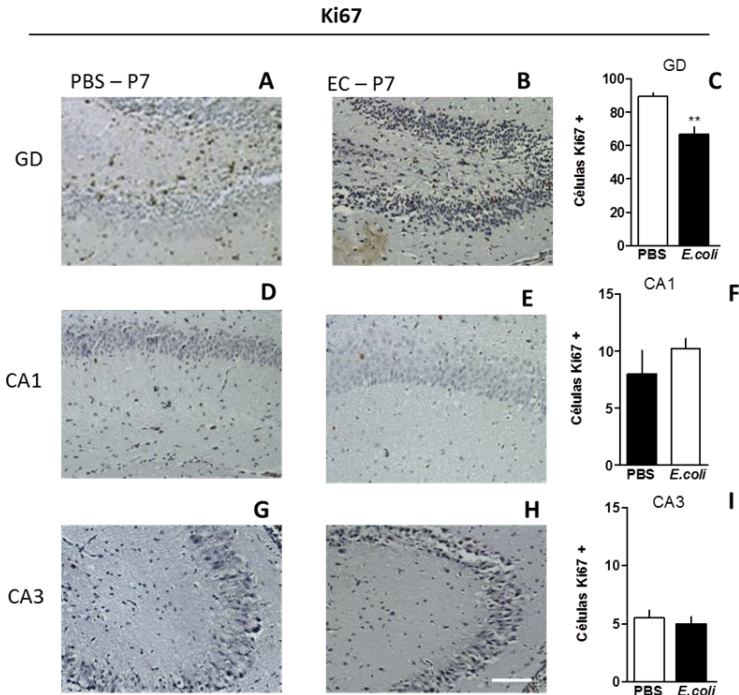


Na Figura 21 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo na região GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Ki67 (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$  e \*  $P < 0,05$ .

$P < 0,05$ . Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ . (n = 3, 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

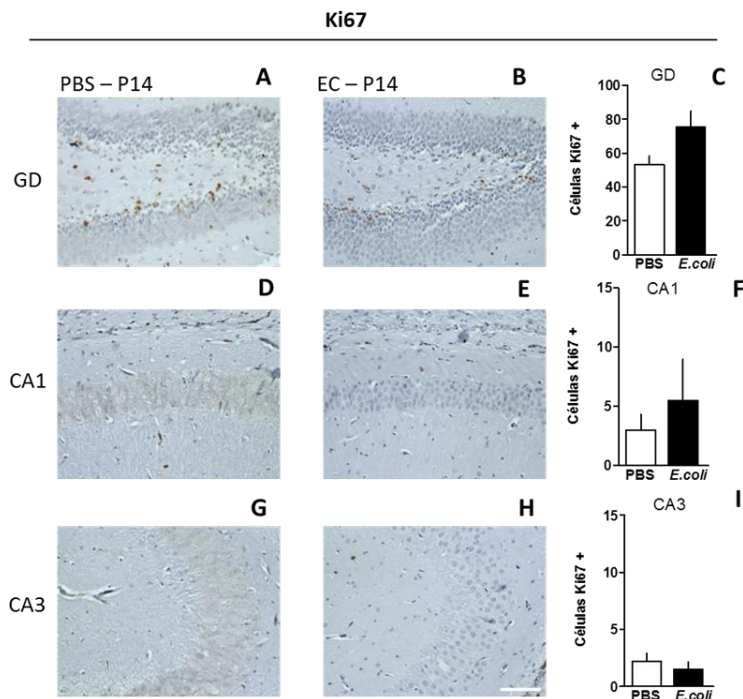
Figura 22 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P7



Na Figura 22 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Ki67 (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$ . Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ , (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

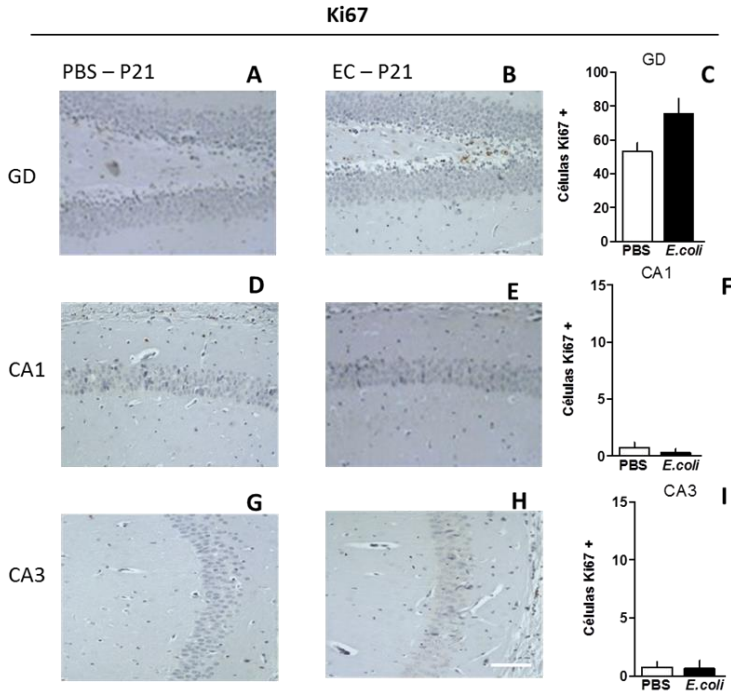
Figura 23 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P14



Na Figura 23 são representadas células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das Células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Ki67 (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 24 – Efeito da infecção bacteriana neonatal sobre o conteúdo da proteína Ki67 em células do hipocampo de camundongos em P21



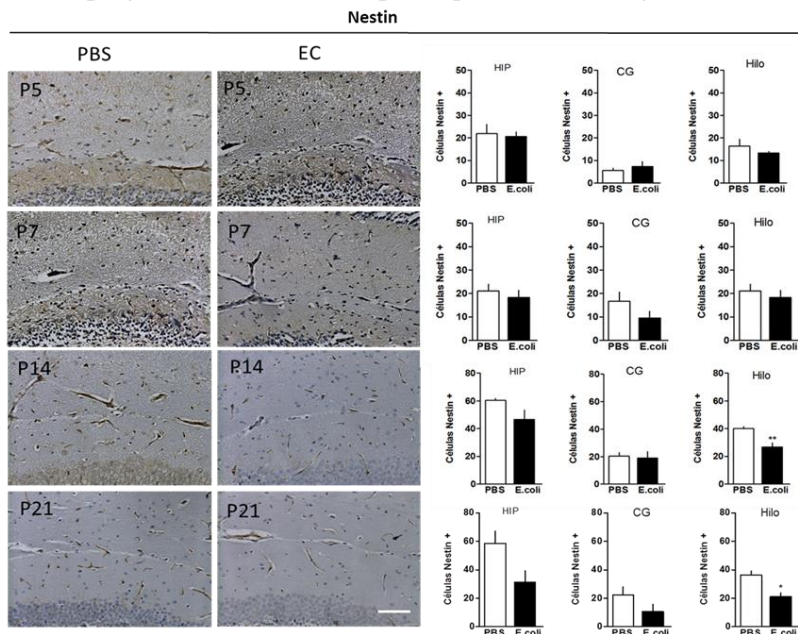
Na Figura 24 são representadas células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para Ki67 (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

A avaliação do número de progenitores neurais das regiões do hipocampo mostra que as células Nestin-positivas analisadas em P5 e P7 após a infecção bacteriana pós-natal não apresentaram diferenças no número de células marcadas, quando comparadas com o grupo controle. Contudo, os animais infectados e analisados em P14 e P21, apresentaram uma diminuição da expressão de Nestin na região do hilo, quando comparados com o grupo controle (Figura 25).



Figura 25 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o número de células progenitoras neurais no hipocampo de camundongos

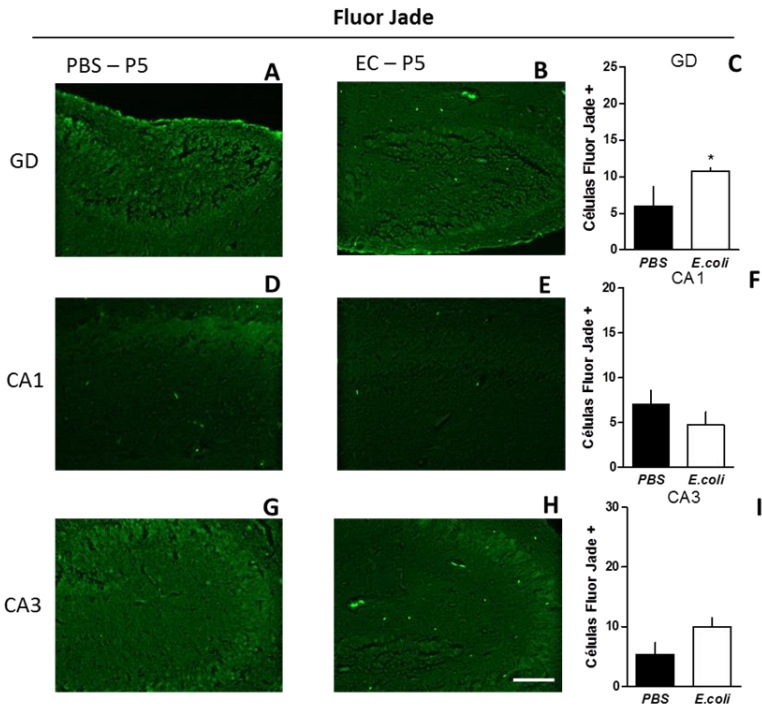


Na Figura 25 são representados os animais submetidos à injeção subcutânea de *E. coli* na dose de  $0,5 \times 10^6$  ou PBS em reação de imuno-histoquímica com o anticorpo Nestin. Os gráficos representam a média do número de células positivas para Nestin 5 (A, B, C, D, E); 7 (F, G, H, I, J); 14 (K, L, M, N, O) e 21 (P, Q, R, S, T), dias após o nascimento, e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$  e\*  $P < 0,05$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m, (n = 3, 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

A análise de morte celular foi avaliada pela coloração de Fluoro-Jade (FJ). As análises demonstram que os animais infectados no período pós-natal apresentaram um maior número de células FJ-positivas em P5, nas regiões CA3 e do GD (Figura 26), e no grupo P14 (Figura 28), apenas na região CA3.

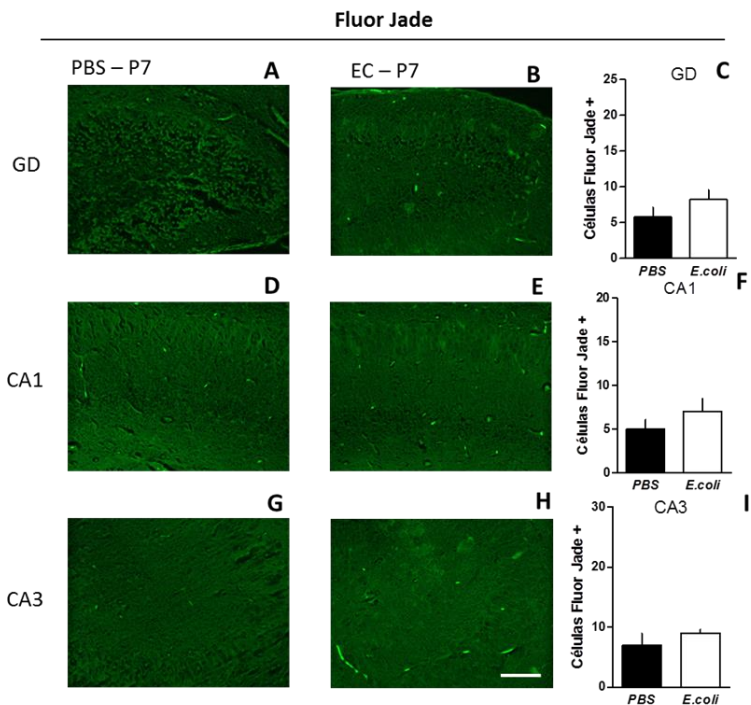
Figura 26 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocâmpais em P5



Na Figura 26 são representadas as células marcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células marcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células marcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células marcadas para FJ (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle  $*P < 0.05$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 3 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

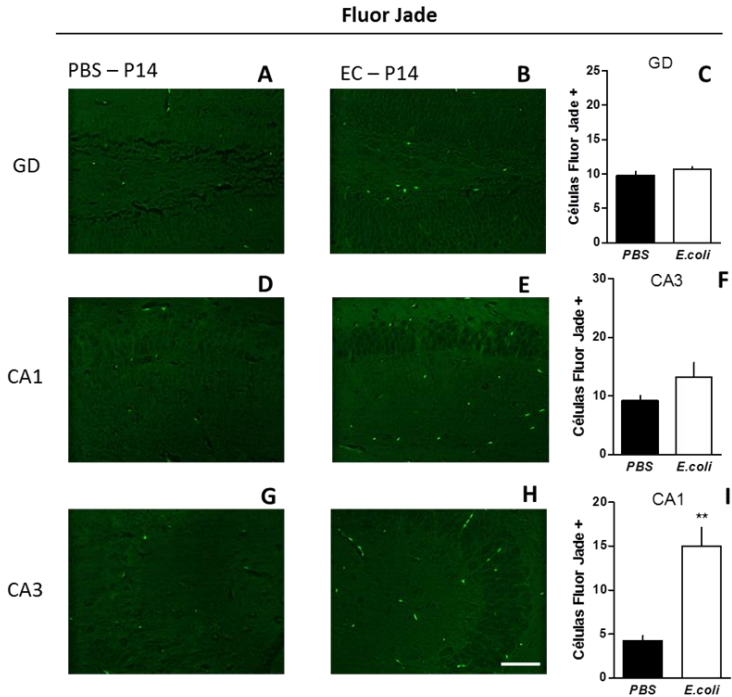
Figura 27 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocâmpais em P7



Na Figura 27 são representadas as células marcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células marcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células marcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células marcadas para FJ (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 3 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

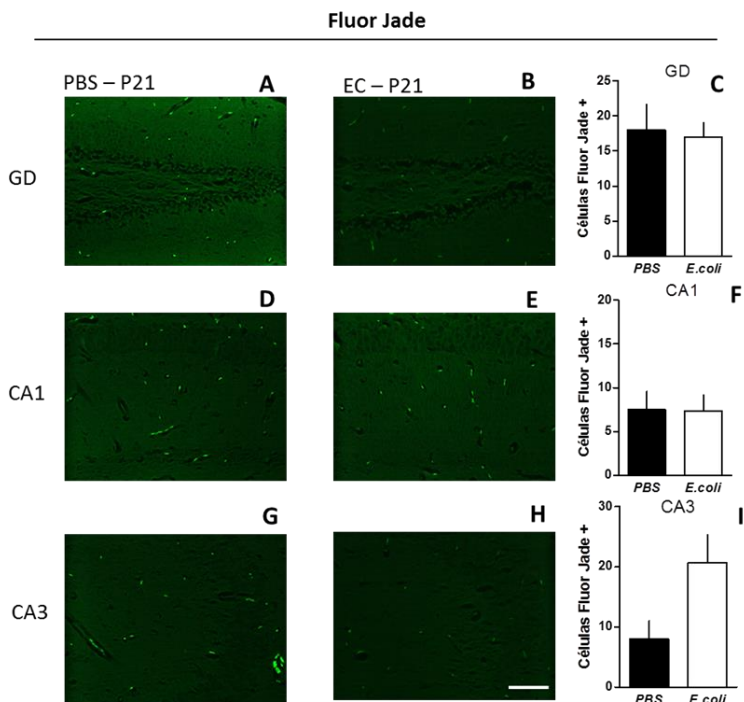
Figura 28 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocâmpais em P14



Na Figura 28 são representadas as células marcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células marcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células marcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células marcadas para FJ (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m, (n = 3 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 29 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em camundongos sobre a morte de células hipocâmpais em P21



Na Figura 29 são representadas as células marcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células marcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células marcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células marcadas para FJ (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 3 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

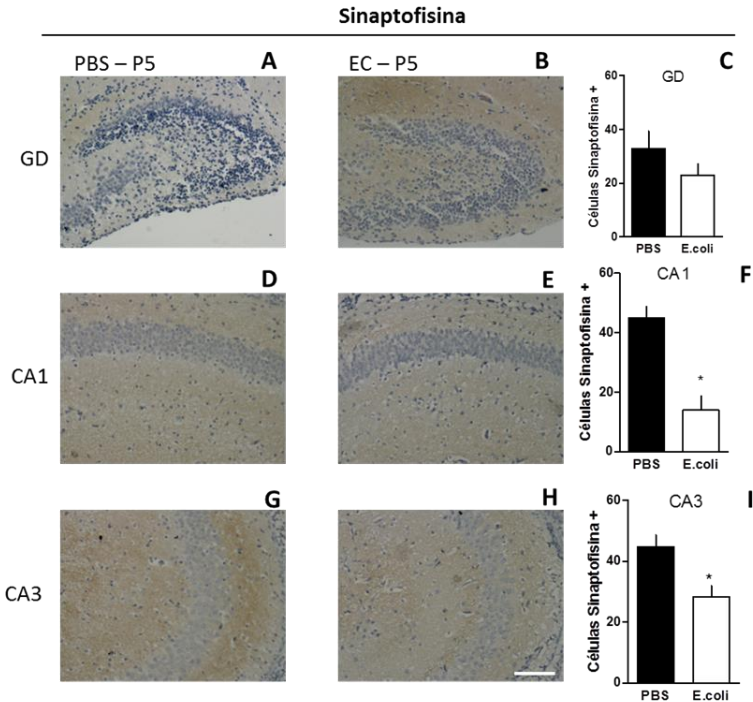
Fonte: Elaborada pela autora (2017).

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À INFECÇÃO NEONATAL

A quantificação do número de sinapses neurais no hipocampo foi evidenciada pela marcação de células positivas para sinaptofisina. Após a infecção bacteriana pós-natal não foi observada em P21, entretanto, a

diminuição da expressão da proteína em P5, nas regiões de CA1 e CA3, (Figura 30) demonstram uma diminuição de sinapses. A diminuição da expressão da proteína também foi observada em P7 (Figura 31) e P14 (Figura 32) na região CA1, em relação ao grupo controle.

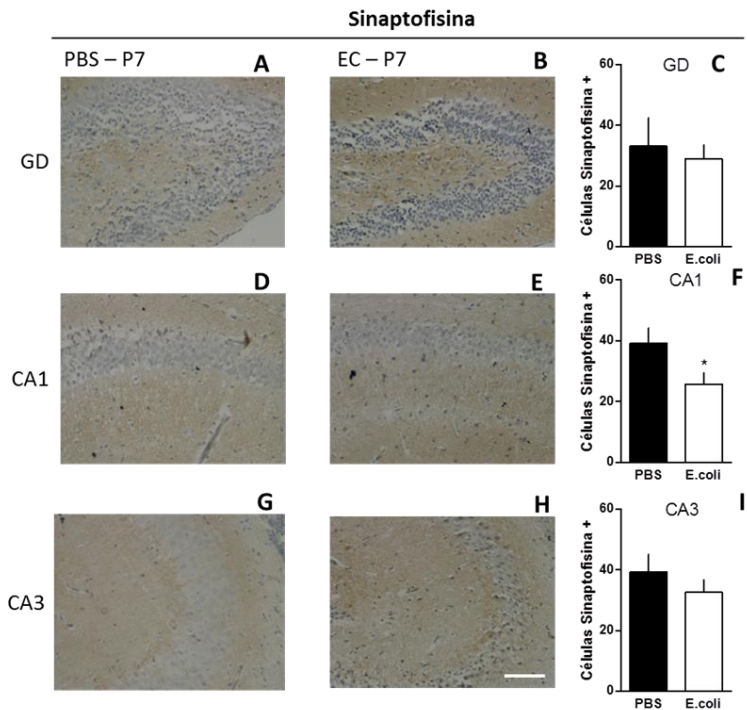
Figura 30 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos P5



Na Figura 30 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para sinaptofisina (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*  $P < 0,05$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 3, 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

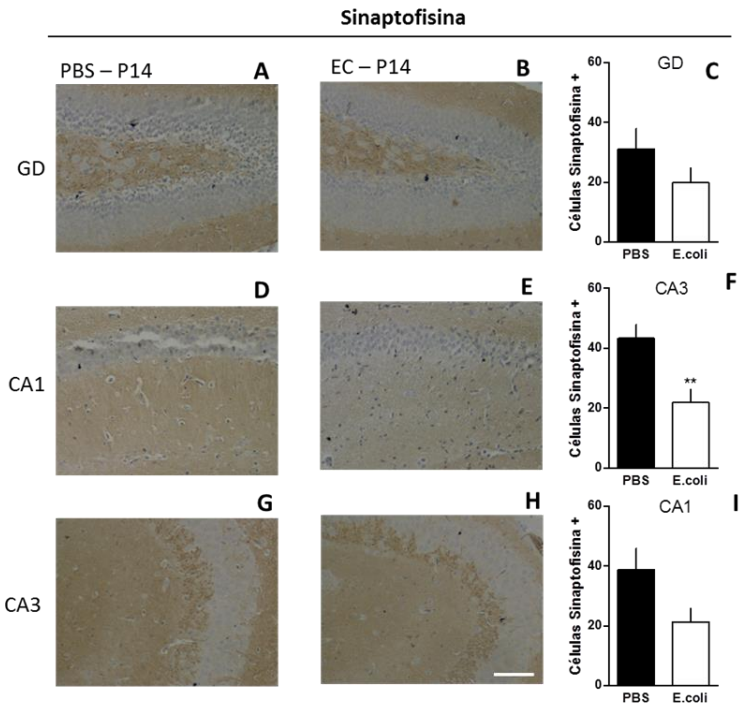
Figura 31 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos em P7



Na Figura 31 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para sinaptofisina (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle  $*P < 0,05$ . Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ . (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Figura 32 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal em sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos em P14

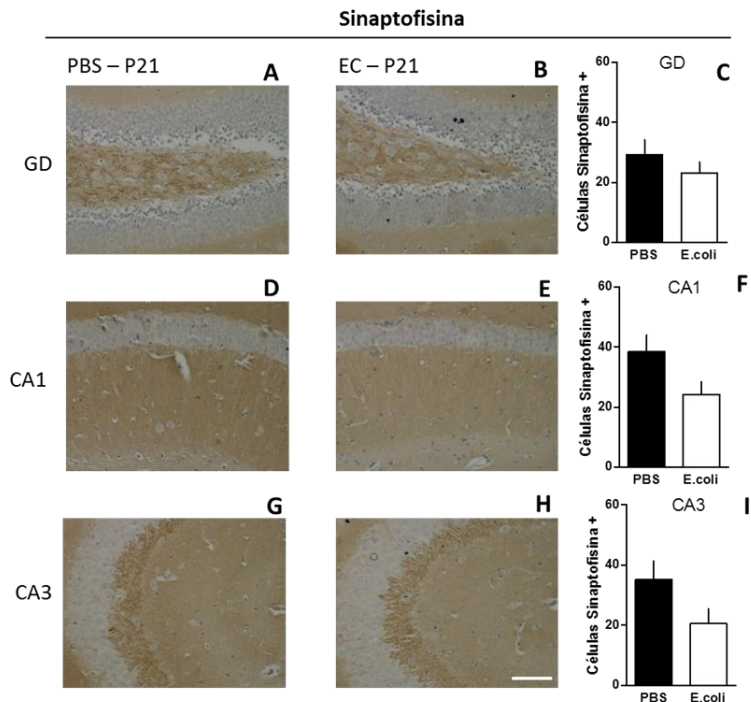


Na Figura 32 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para sinaptofisina (C, F, I) e os dados são representados em média ( $\pm$  EPM), com diferenças significativas em relação ao controle \*\*  $P < 0,01$ . Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).



Figura 33 – Efeito da infecção bacteriana pós-natal sobre o conteúdo da proteína sinaptofisina em células do hipocampo de camundongos em P21



Na Figura 33 são representadas as células imunomarcadas nas regiões do hipocampo, na região GD, expostas ao PBS (A) e tratadas com EC (B), além das Células imunomarcadas na região CA1 expostas ao PBS (D) e tratadas com EC (E) e das Células imunomarcadas na região CA3 expostas do PBS (G) e tratadas com EC (H). Os gráficos representam as quantificações de células imunorreativas para sinaptofisina (C, F, I) e os dados representados em média ( $\pm$  EPM). Barra de escala: 25  $\mu$ m. (n = 5 animais/grupo; 5 campos visuais/grupo).

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

Os resultados em conjunto podem ser melhor compreendidos no quadro-resumo, que apresenta os marcadores utilizados no presente trabalho e que relacionam o tempo decorrido após a infecção e a região analisada. Nas colunas estão dispostos os períodos de tempo analisados, e nas linhas, os marcadores e seus parâmetros de avaliação, juntamente com as regiões estudadas. As marcações positivas representam as

diferenças significativas em relação ao respectivo grupo controle. A idade de P5, em todas as regiões analisadas, mostrou ser a mais crítica após o insulto, pois ocorreu diminuição da proliferação celular, tanto no período pré-natal como no período pós-natal.

Figura 34 – Quadro-resumo dos resultados

QUADRO RESUMO DE ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNOMARCAÇÃO NOS TEMPOS POSNATAIS AVALIADOS												
Região por período Marcador	P5			P7			P14			P21		
	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3
GFAP - Astrócitos	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SY - Sinapses	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3
	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Ki67 Proliferação	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3
	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
FluorJade - Morte celular	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3	GD	CA1	CA3
	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Neu N - Neurônio	GD	CA1	CTX	GD	CA1	CTX	GD	CA1	CTX	GD	CA1	CTX
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Nestin - Progenitor Neural	HP	CA	HI	HP	CA	HI	HP	CA	HI	HP	CA	HI
	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++

Na Figura 34 é feita a representação dos resultados, de forma a evidenciar as marcações positivas para o grau de significância estatística quando apresentados os símbolos “++” para  $P < 0,01$ , “+” para  $P < 0,05$  e “-” quando não foram percebidas diferenças significativas.

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

## 5. DISCUSSÃO

Evidências suportam a hipótese de que infecções cumulativas estão associadas com o desenvolvimento da DA, sugerindo um papel importante dos processos infecciosos e da inflamação na etiologia da doença (LIM et al., 2015). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que a infecção neonatal em camundongos pode induzir prejuízos cognitivos, após um desafio imune na vida adulta (BILBO et al., 2005; LIEBLEIN-BOFF et al., 2013; WILLIAMSON; BILBO, 2014).

Para testar nossa hipótese, de que animais submetidos a infecção pós-natal podem se tornar mais suscetíveis a um segundo evento neurotóxico, elegemos os A $\beta$ Os que são as principais neurotoxinas responsáveis pelos prejuízos cognitivos observados em pacientes e modelos experimentais de DA. Para isso, utilizamos uma dose considerada sub-tóxica por Figueiredo et al. (2013), que demonstraram que animais que recebem injeção intracerebroventricular (icv) de 10 pmol/sítio de A $\beta$ Os apresentam prejuízo cognitivo na tarefa de reconhecimento de objetos 24 horas após injeção, e esse prejuízo persiste no mínimo até o 21º dia de vida. Em contrapartida, injeções icv de 1 pmol/sítio de A $\beta$ Os em camundongos suíços não foram capazes de induzir prejuízo cognitivo nessa mesma tarefa de reconhecimento de novos objetos.

Nesse contexto, nosso estudo avaliou que uma dose não tóxica de A $\beta$ Os para camundongos seria capaz de induzir prejuízo cognitivo, quando associado a uma infecção bacteriana pós-natal. Observamos que a infecção em neonatos é capaz de aumentar a suscetibilidade dos camundongos para desenvolver prejuízo cognitivo após desafio com injeção central de icv de A $\beta$ Os. Nenhum dos grupos experimentais, inclusive os animais infectados com as diferentes doses de *E. coli* no período neonatal, apresentou alterações na capacidade locomotora/exploratória na vida adulta, o que contraria os achados de Lieblein-Boff et al. (2013), que demonstraram que camundongos expostos a *E. coli* ( $1 \times 10^6$  UFC, em P3) apresentam aumento da atividade locomotora e prejuízo da coordenação motora aos 60 dias de vida (P60). Nossos achados com insulto bacteriano pós-natal corroboram com estudos anteriores, que sugerem uma associação entre a presença de processos estressores ou infecciosos (virais e bacterianos) e

intensidade do processo inflamatório, com o desenvolvimento da DA (BU, 2014; LIM, 2015).

O prejuízo cognitivo ocorrido nos animais após a infecção pode estar relacionado a alterações celulares e moleculares ocorridas ao longo do período crítico de neurogênese pós-natal, nas primeiras semanas após o nascimento (GREEN, 2014). Nosso estudo não revelou diferenças significativas entre a massa corporal ou cerebral dos animais infectados com *E. coli*, independentemente de gênero, demonstrando que a dose de  $0,5 \times 10^6$  UFC não é capaz de induzir alterações macroscópicas corporais ou cerebrais em camundongos. Na análise das camadas de células hipocâmpais envolvidas com os processos de memória, verificamos que a infecção bacteriana na dose  $0,5 \times 10^6$  UFC não foi capaz de alterar de maneira significativa a morfometria das camadas de células piramidais das regiões analisadas em CA1 e CA3. Contudo, observamos uma pequena diminuição na camada de células granulares que constituem o GD (Figura 12), 10 dias após a infecção (P14). Esse resultado precisa ser avaliado de maneira cautelosa, considerando necessário aumentar o número de análises para assegurar a fidedignidade das análises. Dessa maneira, experimentos adicionais devem ser realizados para avaliação da influência da infecção neonatal sobre a espessura das camadas moleculares e granulares do hipocampo dos camundongos.

Com o objetivo de utilizar uma metodologia complementar, utilizamos o marcador neuronal Neu N para determinar se o número de células neuronais estava alterado no hipocampo dos animais submetidos à infecção neonatal. Verificamos que os animais que receberam injeção subcutânea de *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) apresentaram um aumento no número de neurônios na região do córtex parietal, quando avaliados 21 dias após o nascimento (Figura 16). Wang et al. (2013) demonstraram que o número de neurônios hipocâmpais, avaliados por meio do marcador Neu N, apresenta-se diminuído no hipocampo de ratos adultos que receberam injeção intraperitoneal de LPS (1 mg/Kg) com 5 dias de vida. Essa diminuição no número de neurônios hipocâmpais durante o período neonatal, induzida pela injeção de LPS, foi acompanhada por alterações comportamentais na vida adulta dos animais (WANG et al., 2013). Um estudo semelhante mostrou que a indução de processo inflamatório por meio de injeção intracerebral de LPS em neonatos

resulta em lesão neuronal na região CA1 em ratos no 21º dia após o nascimento, e prejuízos de aprendizagem e memória na tarefa de esQUIVA inibitória, quando avaliados na vida adulta (FAN et al., 2008). Esses achados reforçam o envolvimento de processos inflamatórios precoces na indução de alterações celulares e moleculares durante o desenvolvimento do SNC (LIN et al., 2015).

A neuroinflamação tem sido frequentemente associada como fator de risco para o desenvolvimento de diferentes doenças neurodegenerativas (GREEN; NOLAN, 2014). Infecções bacterianas sistêmicas são capazes de gerar neuroinflamação (WILLIAMSON et al., 2011) e consequente indução de gliose reativa (BILBO et al., 2009). No presente estudo avaliamos se a infecção neonatal é capaz de induzir astrocitose, utilizando um marcador amplamente utilizado (GFAP). A imuno-histoquímica para GFAP demonstrou que a infecção neonatal não induz aumento da expressão de GFAP logo após o insulto inflamatório, mas induz aumento na intensidade de marcação na região CA3 do hipocampo, 14 dias após injeção subcutânea de *E. coli* (Figura 19). Esses dados corroboram com os achados de Bilbo et al. (2009), que utilizaram a infecção bacteriana pré-natal com o LPS (25 µg/Kg), em P4, e demonstraram ativação microglial exacerbada no hipocampo de animais, sem alteração de expressão da proteína GFAP logo após a infecção neonatal (BILBO et al., 2009).

A diminuição de progenitores neurais, tanto no cérebro adulto como no cérebro em desenvolvimento, parece influenciar a função cognitiva na vida adulta (WANG et al., 2013). Os resultados das análises imuno-histoquímicas para proliferação neural de hipocampo de animais em P5 mostram diminuição de células em proliferação, positivas para o anticorpo anti-KI67, em todas as regiões avaliadas (CA1, CA3 e GD) (Figura 21), sendo esta diminuição observada também na região do GD em P7 (Figura 22). Esses dados sugerem que a proliferação celular é parcialmente interrompida 24 horas após a infecção por *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC), e essa interrupção persiste por até três dias. A presença de progenitores neurais também foi avaliada pela imunorreatividade para nestina, uma proteína presente nos filamentos intermediários do citoesqueleto de células neurais indiferenciadas (MICHALCZK; ZIMAN, 2005). As análises da imunomarcação para nestina também demonstraram uma diminuição dos progenitores neurais hipocampais, principalmente no período de 14-21 dias após o

nascimento (Figura 25). A marcação de Nestin, no hilo do GD, permite-nos dizer que a infecção bacteriana ocorrida em P4 foi capaz de afetar a neurogênese em até 17 dias após a exposição. A diminuição das células progenitoras, positivas para Nestin, pode ter ocasionado uma inadequada regulação do hipocampo, que recruta esses precursores para a formação de novos neurônios (WANG et al., 2013). Tal diminuição no número de células em proliferação pode resultar em uma menor diferenciação de células neurais em uma fase crítica do desenvolvimento cerebral. Esse processo pode ser explicado por estudos que evidenciam que a neurogênese hipocampal na fase adulta é um importante regulador da aprendizagem e memória (DENG et al., 2010; GREEN; NOLAN, 2014; SAXE et al., 2006; STANGL et al., 2009).

Em roedores, a organização da formação do hipocampo ocorre predominantemente nas primeiras semanas após o nascimento, sendo este considerado um período crítico (CHEN; BARAN, 2015). Um dos mecanismos de desenvolvimento elencado como fundamental para essa organização é a programação do ciclo para morte celular (YOUNG, 2017). Na avaliação de morte celular, com a coloração de Fluoro-Jade, observamos que a infecção pós-natal resulta em um aumento imediato da morte celular em até 24 horas (P5) após a infecção com *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC), na região do GD (Figura 26). Quando avaliado em tempos mais tardios (P7, P14 e P21), não foi observada diferença no número de células em degeneração, quando comparado os grupos controle ou infectados com *E. coli* em P4. Esses dados reforçam os achados que demonstram a importante participação do GD nos fenômenos de aprendizado e memória (DENG et al., 2010; GREEN; NOLAN 2014; SAXE et al., 2006; STANGL et al., 2009).

Estudos envolvendo mecanismos de memória vêm documentando uma forte relação entre as alterações morfológicas e um declínio funcional no sistema nervoso central (SNC), interferindo nas redes de conexões para a formação da memória e correlacionando-o a neuropatologias (MOORTHI et al., 2015). Estudos realizados por Escobar et al. (2011) apontam que a exposição ao LPS pré-natal leva a um prejuízo cognitivo na prole de ratos, assim como na plasticidade sináptica na região do hipocampo. Nossos resultados apresentam diminuição na expressão da proteína sinaptofisina nas regiões de CA1 e CA3, 24 horas após infecção (P5) (Figura 30). A diminuição dessa

proteína também foi observada em animais no 14º dia após o insulto inflamatório (Figura 32). As alterações sinápticas encontradas em P5 e P14 não nos permitem afirmar que essa diminuição persistiu na vida adulta, visto que tal perda sináptica não foi observada em P21. O estudo realizado por Escobar e colaboradores (2011) demonstrou que a exposição de ratos neonatos ao LPS parece resultar em disfunções cerebrais tardias, como déficits de aprendizagem em ratos. Por essa razão, serão necessários estudos complementares em animais adultos após o segundo evento inflamatório para descrever possíveis prejuízos sinápticos na vida adulta desses animais expostos a infecção no período neonatal.

Com o presente estudo podemos sugerir que a infecção bacteriana pós-natal em fases iniciais (P4) pode interferir nos mecanismos de plasticidade hipocampal de camundongos adultos, dificultando a neurogênese, causando déficits cognitivos relacionados à memória. Extrapolando esses dados para seres humanos, podemos relacionar os resultados a pacientes com Alzheimer do tipo esporádica, que independe de causas genéticas, mas que apresentam a sintomatologia da doença. Esses dados poderão contribuir para os estudos futuros de mecanismos envolvidos na patologia de Alzheimer do tipo esporádica.





## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O conjunto de resultados nos permite afirmar que a infecção bacteriana pós-natal em P4 ( $0,5 \times 10^6$  UFC) pode ser considerada um fator de risco para a predisposição desses animais a um prejuízo cognitivo na vida adulta, sendo este relacionado à DA, quando associado a uma indução com A $\beta$ O.

Os experimentos comportamentais demonstram que a infecção por *E. coli* é capaz de causar dano cognitivo na vida adulta, dependendo da dose utilizada. O teste de RO mostrou que a infecção por *E. coli* na maior dose ( $1 \times 10^6$  UFC) foi capaz de causar dano cognitivo nesses animais, o que não ocorreu com a dose inferior ( $0,5 \times 10^6$  UFC). Contudo, quando associada ao desafio com A $\beta$ O, o dano cognitivo foi evidenciado.

A infecção causada por *E. coli* ( $0,5 \times 10^6$  UFC) não foi capaz de induzir alterações no peso corporal ou cerebral em camundongos. Em avaliações microscópicas, a morfometria das regiões do hipocampo não nos permite concluir que a espessura das camadas de células que compõem essas regiões possa ter influenciado nos resultados, pois esta alteração só se mostrou significativa em P14 em apenas uma região analisada.

As análises imuno-histoquímicas, relacionadas à infecção bacteriana pós-natal, evidenciam a diminuição da proliferação celular no hipocampo dos animais 24 horas após serem infectados. Esses dados podem ser observados pela marcação positiva para Ki67, que persiste até três dias após a infecção, no GD do hipocampo destes animais. Da mesma forma, as análises de morte celular demonstram que a infecção pós-natal resulta em um aumento imediato da morte celular em até 24 horas (P5).

As alterações sinápticas encontradas em P5 e P14 não permitem afirmar que essa diminuição persistiu na vida adulta, visto que essa perda sináptica não foi observada em P21.

Os resultados deste estudo nos permitem dizer que a infecção bacteriana pós-natal (P4) em camundongos pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer na vida adulta.

Como perspectivas futuras, levando-se em consideração que a doença de Alzheimer (DA) é multifatorial, e que hábitos dos indivíduos ao longo da vida são implicados no aparecimento ou na progressão da doença, faz-se necessária a ampliação e o aprofundamento dos estudos envolvendo infecções e neuropatologias.

Para maior compreensão e visando à complementação dos dados, pretende-se investigar a manifestação da doença em animais, aos 90 dias de vida, a presença de inflamação nos cérebros desses animais após a dose subtóxica de beta-amiloide. Com isso, será possível selecionar alguns dos marcadores utilizados no presente estudo, visando contribuir para a melhor elucidação dos mecanismos que envolvem a patologia da doença e suas prováveis causas – dessa forma, contribuindo ainda mais para investigação de infecções perinatais e sua relação na causalidade ou quanto à predisposição dos indivíduos à doença de Alzheimer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, P.; MORRIS R.; AMARAI D.; BLISS T., O'KEEFE, J. **The Hippocampus Book**. New York, NY: Oxford University Press, 2007.
- ALTMAN, J.; D.Das, G. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of Comparative Neurology**, vol. Published by Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 124 pp: 319-335 [dx.doi.org/10.1002/cne.901240303](https://doi.org/10.1002/cne.901240303), 1965.
- ALTMAN, J; BAYER, S.A. Histological materials of the developing rat brain **Histological Lidrary**. Disponível em: <https://braindevelopmentmaps.org/home/brain-map-sets/postnatal-neurogenesis-in-the-developing-hippocampus>. Acesso em: 30 jul. 2017.
- BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S. K.; SRIVASTAVA, L. K. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. **Schizophr Bull** 38(3): 444-456, 2012.
- BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiol Dis** 37(1):26-32, 2010.
- BILBO S.D.; BIEDENKAPP J.C.; DER-AVAKIAN A., WATKINS L.R.; RUDY J.W; MAIER, S.F. Neonatal Infection-Induced Memory Impairment after Lipopolysaccharide in Adulthood Is Prevented via Caspase-1 Inhibition; 25(35):8000–9, 2005.
- BILBO, S.D; SCHWARZ J.M.; COE C. **Early-life programming of later-life brain and behavior** : a critical role for the immune system; 3(August):1–14, 2009.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behav. Imm.** 24, 881–897. doi: 10.1016/j.bbi.2010.03.005, 2010.
- BRYDON, L.; HARRISON, N. A.; WALKER, C.; STEPTOE, A.; CRITCHLEY, H. D. Peripheral inflammation is associated with altered

substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans. **Biol. Psychiatry** 63, 1022–1029, 2008.

BU, X. L.; YAO, X. Q.; JIAO, S. S.; ZENG, F.; Liu, Y. H.; XIANG, Y.; ... & YI, X. A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, 22(12), 1519–1525, 2015.

CASTELLANI, R. J.; R. K. ROLSTON; M. A. SMITH. Alzheimer disease. **Dis Mon** 56(9): 484–546, 2010.

CHEN, Y; BARAM, T.Z.; Toward Understanding How Early-Life Stress Reprograms Cognitive and Emotional Brain Networks. **Nature Publishing Group**; 41(1):197–206.[doi.org/10.1038/npp.2015.181](https://doi.org/10.1038/npp.2015.181), 2015

CUI, K.; H. ASHDOWN; G. N. LUHESHI; P. BOKSA. Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. **Schizophr Res** 113(2-3): 288–297, 2009.

DANTZER, R. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews neuroscience** 9.1: 46–56, 2008.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature Reviews. Neuroscience**, 11(5), 339–350. [doi.org/10.1038/nrn2822](https://doi.org/10.1038/nrn2822), 2010.

ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L.; SEMIN. The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Immunopathol** 31: 497. [doi:10.1007/s00281-009-0177-0](https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0), 2009

ENNACEUR A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioural Brain Research** 47–59, 31. [doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X), 1988.

ESCOBAR, M.; CROUZIN, N.; CAVALIER, M.; QUENTIN, J.; ROUSSEI, J.; LANTÉ, F., ... & BARBANEL, G. Early, time-dependent disturbances of hippocampal synaptic transmission and plasticity after in utero immune challenge. **Biological psychiatry**, 70(10), 992–999, 2011.

FAN, L.W.; TIEN, L.T.; MITCHELL, H. J.; RHODES, P. G. and CAI, Z.  $\alpha$ -Phenyl-n-tert-butyl-nitron ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide. **European Journal of Neuroscience**, 27:1475–1484. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06121, 2008

FATEMI, S.H; FOLSOM, T.D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. **Schizophr Bull.**; 35(3):528-548.doi:10.1093/schbul/sbn187, 2009.

FIGUEIREDO, C. P.; BICCA, M. A; LATINI A.; PREDIGER, R. D. MEDEIROS R.; . CALIXTO, J.B.. Folic acid plus alpha-tocopherol mitigates amyloid-beta-induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. **J Alzheimers Dis** 24(1):61-75., 2011.

FIGUEIREDO, C. P., CLARKE, J. R.; LEDO, J. H.; RIBEIRO, F. C.; COSTA, C. V MELO H. M; MOTA-SALES A. P.; SARAIVA L. M.; KLEIN, W.L.; SEBOLLELA, A. FELICE F. G.; De and FERREIRA, S. T. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight abeta oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. **J Neurosci** 33(23):9626-9634, 2013.

FRIEDMAN, W.J. Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. **Exp Neurol.**;168(1):23-31. doi:10.1006/exnr.2000.7595, 2001.

GARBETT, K.; EBERT, P.J., MITCHELL. A. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. **Neurobiol Dis.**;30(3):303-311. doi:10.1016/j.nbd.2008.01.012, 2008.

GOMEZ-NICOLA D, SUZZIS, VARGAS-CABALLERO M, et al. Temporal dynamics of hippocampal neurogenesis in chronic neurodegeneration. **Brain.**; 137(Pt 8):2312-2328. doi:10.1093/brain/awu155, 2014.

GREEN H.F.; NOLAN, Y.M. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Inflammation and the developing brain : Consequences for hippocampal neurogenesis and behavior. **Neurosci Biobehav Rev** [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;40:20–34.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.004, 2014.

GREENE, J. D.; J. R. HODGES and A. D. BADDELEY.  
Autobiographical memory and executive function in early dementia of Alzheimer type. **Neuropsychologia** 33(12): 1647-1670, 1995.

HENEKA, M.T. et al. **Neuroinflammation in Alzheimer's disease**.  
The Lancet Neurology , Volume 14 , Issue 4 , 388 - 405, 2015.

KNOBLOCH, M.; KONIETZKO, U.; NITSCH R.M.; MANSUY, I.M..  
A Oligomer-Mediated Long-Term Potentiation Impairment Involves Protein Phosphatase 1-Dependent Mechanisms. 2007;27(29):7648-7653.  
doi:10.1523/**J neurosci**. 0395-07.2007.

KNUESEL, I. et al. Maternal immune activation and abnormal braindevelopment across CNS disorders, **Nat. Rev. Neurol**.  
doi:10.1038/nrneurol.2014.187, 2014

LAJUD N, TORNER L. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. **Front Mol Neurosci**; 8 (February): 3.  
doi:10.3389/fnmol.2015.00003, 2014

LAVENEX, P., BANTA, P. Building hippocampal circuits to learn and remember : Insights into the development of human memory. **Behav Brain Res** Elsevier B.V.; 254:8–21.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.007, 2013.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2 ed. São Paulo: Ateneu, 2005.

LIEBLEIN-BOFF, J. C.; MCKIM, D. B.; SHEA, D. T.; WEI, P.; DENG, Z.; SAWICKI, C., et al. Neonatal *E. Coli* Infection Causes Neuro-Behavioral Deficits Associated with Hypomyelination and Neuronal Sequestration of Iron.;33(41):16334–45, 2013

LIM, S.L; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; KITAZAWA, M. Infection , systemic inflammation , and Alzheimer’s disease. **Microbes Infect**. Elsevier Masson SAS;17(8):549–56.doi.org/10.1016/j.micinf.2015.04.004, 2015.

LOGROSCINO, G. The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? **Environ Health Perspect** 113(9): 1234-1238, 2005.

LORENTE DE NÓ. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the Ammonic system. **J. Psychol. Neurol.** 46, 113–177., 1934.

LULL, M.E. & BLOCK, M.L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. **Neurotherapeutics** 7: 354.  
doi:10.1016/j.nurt.2010.05.014, 2010.

MARTYN, C. N. Infection in childhood and neurological diseases in adult life. **Br Med Bull** 53(1): 24-39, 1997.

MCKHANN, G.; DRACHMAN D.; FOLSTEIN M.; KATZMAN R.; PRICE D. AND STADLAN E. M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology** 34(7): 939-944, 1984.

MELDRUM, S. J.; STRUNK T.; CURRIE A.,; PRESCOTT S. L.; SIMMER K. and WHITEHOUSE, A. J. Autism spectrum disorder in children born preterm-role of exposure to perinatal inflammation. **Front Neurosci**7: 123, 2013.

MICHALCZYK K, ZIMAN M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. **Histol. Histopathol.** 20 (2): 665–71. PMID 15736068., 2005.

MOORTHI, P.; PREMKUMAR P.; PRIYANKA, R.; JAYACHANDRAN K.S.; ANUSUYADEVI, M. Pathological changes in hippocampal neuronal circuits underlie age-associated neurodegeneration and memory loss: positive clue toward sad. **Neurosci IBRO**;301:90–105.  
doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.062, 2015.

MOSES, L.J; BALDWIN, D.A. What Can the Study of Cognitive Development Reveal About Children's Ability to Appreciate and Cope with Advertising?. *Journal of Public Policy & Marketing*: Fall, Vol. 24, No. 2, 186-201, 2005.

OSKVIG, D.B.; ELKAHLOUN, A.G.; JOHNSON K.R.; PHILLIPS, T.M.; HERKENHAM, M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain Behav Immun.** 2012;26(4):623-634. doi:10.1016/j.bbi.2012.01.015, 2012.

PABLOS R.M. De; HERRERA A.J.; ESPINOSA-OLIVA A.M.; SARMIENTO, M. MUÑOZ, M.F.; MACHADO, A. et al. Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation.;1–18.,2014.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain : implications for chronic neurodegenerative disease. 2004;18:407-413. doi:10.1016/j.bbi.2004.01.004., 2004.

PLETNIKOV, M. V.; T. H. MORAN and K. M. CARBONE. Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. **Front Biosci** 7: d593-607.2002.

QUERFURTH, H. W. and F. M. LAFERLA. Alzheimer's disease. **N Engl J Med** 362(4): 329-344, 2010.

RIKSSON, P.E.S.E; ERFILIEVA, E.K.P.; RIKSSON T.H.B.J. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus.;4(11):1313-1317, 1998.

SAHAY, A.; SCOBIE, K.N.; HILI, A.S.; O'CARROLL, C.M.; KHEIRBEK, M.A.; BURGHARDT, N.S., ... HEN, R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, 472 (7344), 466-470. oi.org/10.1038/nature09817, 2011.

SAXE, M. D.; BATTAGLIA, F., WANG, J.W.; MALLERET, G.; DAVID, D. J.; MONCKTON, J. E., ... DREW, M. R. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(46), 17501–17506. doi.org/10.1073/pnas.0607207103, 2006.

SOFRONIEW, M., V.; VINTERS, H. V. Astrocytes:biology and pathology. **Acta Neuropatholol**, v. 119, p.7-35.,2010.



SPALDING, K.L.; BERGMANN, O.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; HUTTNER, H.B.; et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**. Jun 6 ;153(6):1219–27, 2013.

STANGL, D., and THURET, S. Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. **Genes & Nutrition**, 4(4), 271–282.doi.org/10.1007/s12263-009-0134-5, 2009.

TABATON, M.; NUNZI, M. G.; XUE, R.; USIAK, M.; AUTILIOGAMBETTI, L.; GAMBETTI, P.; Soluble Amyloid  $\beta$ -Protein Is a Marker of Alzheimer Amyloid in Brain But Not in Cerebrospinal Fluid Biochem. **Biophys. Res. Commun**, 200-1598.,1994.

TANZI R.E. The Genetics of Alzheimer Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 1 de outubro; 2 (10). Pii: a006296. doi: 10.1101 / cshperspect.a006296, 2012

TSENG, K. Y., CHAMBERS, R. A., & LIPSKA, B. K. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, 204(2), 295–305. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.039>., 2009.

VAN BEEK, A. H. and J. A. CLAASSEN (2011). The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. **Behav Brain Res** 221(2): 537-542., 2011.

YIRMIYA R and GOSHEN I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behav. Immun.**;25(2):181-213. doi:10.1016/j.bbi.2010.10.015., 2011.

YOU, L.H.; YAN, C.Z.; ZHENG, B.J.; Ci, Y.Z.; CHANG, S.Y.; YU, P.; CHANG, Y. Z. Astrocyte hepcidin is a key factor in LPS-induced neuronal apoptosis. **Cell Death & Disease**, 8(3), e2676–.doi.org/10.1038/cddis.2017.93, 2017.

WALSH, D. M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J. V.; CULLEN, W. K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J.; Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. **Nature**, 416, 535.,2002.

WALDEMAR, G.; PHUNG K. T; BURNS A. ; GEORGES J.; HANSEN F. R.; ILIFFE S.; MARKING C.; RIKKERT M. O.; SELMES J.; STOPPE G. and SARTORIUS N. Access to diagnostic evaluation and treatment for dementia in Europe. **Int J Geriatr Psychiatry** 22(1): 47-54, 2007.

WANG, K.; FAN, L.; KAIZAKI, A.; PANG, Y.; CAI, Z.; TIEN, L.; Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment , less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. **Neuroscience.**;234:146-157.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2012.12.049., 2006.

WATANABE, Y.; SOMEYA, T. and NAWA, H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. **Psychiatry Clin Neurosci** 64(3): 217-230., 2010.

WILLIAMSON, L. L.; SHOLAR P. W.; MISTRY R. S. ; SMITH, S. H. and BILBO S. D. Microglia and memory: modulation by early-life infection. **J Neurosci** 31(43): 15511-15521., 2011.

WILLIAMSON, L. L and BILBO S. D. Neonatal infection modulates behavioral flexibility and hippocampal activation on a Morris Water Maze task. NIH Public Access. **Physiol Behav.**; April 22:152–9 .  
0.1016/j.physbeh.2014.02.033, 2014.

WRIGHT, S. D.; RAMOS R. A.; TOBIAS P. S.; ULEVITCH R. J. and MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science** 249(4975): 1431-1433., 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**: a public health priority. Geneva: WHO, 2012.

VIOLA, K. L.; VELASCO, P. T.; KLEIN W. L. Why Alzheimer's is a disease of memory: the attack on synapses by Abeta oligomers (ADDLs). **J Nutr Health Aging**. Jan;12(1):51S-7S, 2008.