



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

**ENCEFALITE VIRAL INDUZIDA PELO VÍRUS DA DENGUE EM
CAMUNDONGOS SUÍÇOS ALBINOS: A resposta inflamatória no sistema
nervoso central do hospedeiro neonato**

MAÍRA CATHERINE PEREIRA TURIEL

**BELÉM - PARÁ
2011**

MAÍRA CATHERINE PEREIRA TUIEL

**ENCEFALITE VIRAL INDUZIDA PELO VÍRUS DA DENGUE EM
CAMUNDONGOS SUÍÇOS ALBINOS: A resposta inflamatória do sistema
nervoso central do hospedeiro neonato**

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

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof.º Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

**BELÉM - PARÁ
2011**

MAÍRA CATHERINE PEREIRA TUIEL

**ENCEFALITE VIRAL INDUZIDA PELO VÍRUS DA DENGUE EM
CAMUNDONGOS SUÍÇOS ALBINOS: A resposta inflamatória do sistema
nervoso central do hospedeiro neonato**

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

Banca Examinadora:

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

Avaliador: Profª. Drª. Márcia Consentino Kronka Sosthenes
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliador: Profª. Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior
Instituto Evandro Chagas (IEC)

**BELÉM - PARÁ
2011**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e a certeza do crescimento profissional.

À minha família por toda credibilidade, paciência e apoio incondicional, principalmente aos meus pais, apoiadores assíduos de tudo que fiz e modelo de perseverança, persistência e garra.

Agradeço ao meu namorado Tarcísio Nery pela paciência, tolerância e compreensão nos horários que eu ia para o Laboratório, pelas caronas indispensáveis nos momentos mais importantes e pela ajuda na elaboração das minhas planilhas estreológicas.

Aos professores João Bento pela confiança, paciência, e tranquilidade nos momentos finais da dissertação, que foram indispensáveis; Cristovam por me orientar nesta dissertação, me fazendo ver novos horizontes de pesquisa; Márcia, por ser o porto seguro nos momentos de dúvidas e sempre oferecer apoio e excelentes conselhos. Agradeço a esses três professores pela orientação indispensável neste trabalho.

Aos amigos que fiz dentro do laboratório Lucas, Juliana, Renata, Carlos, Fábio, Aline, Nara, e as pessoas do Projeto Dengue que entre entradas e saídas de integrantes conseguimos fazer dar certo o modelo do qual este trabalho fez parte, agradeço ao Brunno, Giovanni (pela imunos), Daniel, César (por azarar minhas células durante a contagem e pela reconstrução), Carla por terem me ajudado nesta tarefa.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

*“Caminhar apesar da distância;
Vencer apesar dos obstáculos;
sonhar apesar das decepções;
sorrir apesar das angústias;
acreditar acima de tudo”*

Daniel Silveira

RESUMO

Para estudar a resposta imune inata produzida especificamente no interior do SNC em desenvolvimento, evitando a influência do sistema imune, empregamos modelo de infecção viral induzida pela inoculação intracerebral do vírus da dengue em camundongos neonatos. Oito camundongos lactentes de dois dias de idade da espécie *Mus musculus* e variedade suíça albina foram inoculados por via intracerebral com homogenado cerebral infectado com a espécie Flavivirus (DENV3 genótipo III). Outro conjunto de animais foi utilizado como controle (não infectado) e inoculado com igual volume de homogenado cerebral não infectante e mantidos nas mesmas condições dos infectados. Decorridos 7 dias após a infecção os camundongos doentes foram sacrificados e tiveram seus cérebros processados para imunomarcagem de astrócitos e microglias. Quantificou-se a resposta imune glial no stratum lacunosum moleculare (Lac Mol), radiatum (Rad) e pyramidale (Pir) de CA1-2 do hipocampo e na camada molecular do giro denteado (GDMol) usando o fracionador óptico para estimar o número de microglias e astrócitos em animais infectados e controles. Intensa astrocitose reativa e intensa ativação microglial foram encontradas em animais neonatos com sinais clínicos de meningoencefalite. Entretanto, embora tenham sido maiores as estimativas do número de microglias ativadas nos infectados (Inf) do que nos animais controles (Cont) nas camadas GDMol (Inf: $738,95 \pm 83,07$; Cont: $232,73 \pm 70,38$; $p = 0,0035$), Rad (Inf: $392,49 \pm 44,13$; Cont: $62,76 \pm 15,86$; $p = 0,0004$), em relação ao número total de microglias (ativadas ou não) apenas o stratum radiatum mostrou diferença significativa (Inf: $6.187,49 \pm 291,62$; Cont: $4.011,89 \pm 509,73$; $p = 0,01$). Por outro lado apenas a camada molecular do giro denteado mostrou diferença no número de astrócitos (Inf: $8.720,17 \pm 903,11$; Cont: $13.023,13 \pm 1.192,14$; $p = 0,02$). Tomados em conjunto os resultados sugerem que a resposta imune inata do camundongo neonato à encefalite induzida pelo vírus da dengue (sorotipo 3, genótipo III) está associada a um maior aumento do número de microglias do que de astrócitos reativos e essa mudança é dependente da camada e da região investigada. As implicações fisiopatológicas desses achados permanecem por ser investigadas.

Palavras-chave: dengue, encefalite viral, astrócitos, microglia, estereologia, camundongo neonato.

ABSTRACT

To study the innate immune response produced specifically within the developing CNS, avoiding the influence of the immune system, employ viral infection model induced by intracerebral inoculation of dengue virus in neonatal mice. Eight newborn mice two days old of the species *Mus musculus* and Swiss albino variety were inoculated intracerebrally with brain homogenate infected with Flavivirus species (DENV3 genotype III). Another group of animals was used as control (uninfected) and inoculated with an equal volume of non-infectious brain homogenate and maintained under the same conditions of those infected. After 7 days after infection the mice were sacrificed and patients have had their brains processed for immunostaining of astrocytes and microglia. We quantified the glial and astrocytic immune response in the stratum lacunosum molecular (Lac Mol), radiatum (Rad) and pyramidale (Pir) of hippocampus and in the stratum molecular of dentate gyrus (DGMol) using the optical fractionator to estimate the number of microglia and astrocytes in the hippocampus of infected and control animals. Intense reactive astrocytosis and microglial activation were associated with clinical signs of meningoencephalitis in neonate subjects. Although the number of activated microglia to be higher in infected than in control subjects in the GDMol (Inf: $738,95 \pm 83,07$ vs Cont: $232,73 \pm 70,38$; $p = 0,0035$), Rad (Inf: $392,49 \pm 44,13$ vs Cont: $62,76 \pm 15,86$; $p = 0,0004$) the number of total microglia (activated or not) was different only in the stratum radiatum (Inf: $6.187,49 \pm 291,62$; Cont: $4.011,89 \pm 509,73$; $p = 0,01$). On the other hand the total number of astrocytes was higher in control than in infected subjects only in the DGMol (Inf: $8.720,17 \pm 903,11$; Cont: $13.023,13 \pm 1.192,14$; $p = 0,02$). Taken together the results suggest that the immune innate response in neonate mice after encephalitis induced by DENV3 genotype III is associated with a higher increase in the activated microglia than astrocytes in a regional and laminar-dependent fashion. The pathophysiology implications of these events remain to be investigated.

Key-words: Dengue, Viral encephalitis, astrocytes, microglia, stereology, neonate mice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
Figura 1: Células microgliais em cérebro saudável e seus processos.....	16
Figura 2: Microglias ativadas após uma lesão na barreira hematoencefálica.....	17
Figura 3: Morfologia da microglia.....	19
Figura 4: Características morfológicas de astrócitos.....	20
Figura 5: Fotomicrografia de secção horizontal do hipocampo imunomarcadas para IBA-1 contracorada por Nissl para ilustrar a delineação das camadas de interesse.....	30
Figura 6: Fotomicrografias de secções horizontais do hipocampo imunomarcadas para GFAP para ilustrar os astrócitos e as camadas de interesse.....	37
Figura 7: Reconstrução tridimensional de astrócitos da camada molecular do giro denteado de camundongos controle e infectado.....	38
Figura 8: Fotomicrografias mostrando o mapa encefálico da resposta inflamatória microglial pelas células imunomarcadas para IBA-1.....	39
Figura 9: Fotomicrografias de diferentes tipos e morfologias celulares imunomarcadas para IBA-1 em um animal infectado.....	40
Figura 10: Fotomicrografias de secções horizontais do hipocampo imunomarcadas para IBA-1.....	41
Figura 11: Fotomicrografias mostrando os diferentes fenótipos das células microgliais imunomarcadas para IBA-1.....	42
Figura 12. Gráfico com as estimativas para o número de microglias totais para a camada e as camadas Lac Mol, Rad e Pir de CA1-2.....	49
Figura 13: Gráfico com estimativas do número de microglias ativadas para a camada GDMol e as camadas Lac Mol, Rad e Pir de CA1-2.....	50
Figura 14: Gráfico com estimativas do número de astrócitos para as camadas molecular do giro denteado e a camada lacunoso molecular de CA1-2.....	50
Figura 15: Desenho esquemático sobre as deformações sofridas pelo tecido na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento.....	56

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1: Especificação dos anticorpos e diluição utilizados nas reações imunohistoquímicas.....	29
Tabela 2: Parâmetros estereológicos para as 4 camadas de interesse.....	33
Tabela 3: Valores paramétricos e a estimativa total de astrócitos na camada molecular do giro denteado.....	43
Tabela 4: Valores paramétricos e a estimativa total de astrócitos na camada lacunoso molecular de CA1-2.....	44
Tabela 5: Valores paramétricos e a estimativa total de microglias na camada molecular do giro denteado.....	45
Tabela 6: Valores paramétricos e a estimativa total de microglias na camada lacunoso molecular de CA1-2.....	46
Tabela 7: Valores paramétricos e a estimativa total de microglias na camada radiatum de CA1-2.....	47
Tabela 8: Valores paramétricos e a estimativa total de microglias na camada pyramidale de CA1-2.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – Avidin-biotin complex

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

ATP – Trifosfato de adenosina

CA – Corno de Amon

CE – Coeficiente de Schaffer

CONT – Controle

CV² – Coeficiente de Variação

CVB² – Coeficiente de Variação Biológica

DAB – Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DENV – Vírus da dengue

DPI – Dias pós inoculação

GD – Giro denteado

GD MOL – Camada molecular do giro denteado

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar glial

IBA-1 – Ionized calcium binding adapter molecule 1

IEC – Instituto Evandro Chagas

INF – Infectado

JEV – Vírus da encefalite japonesa

LAC MOL – Camada lacunoso molecular

MOM – Mouse-On-Mouse

MVE - Vírus da encefalite de Murray Valley

N – número total de células

PB – Tampão fosfato

PBS – Tampão fosfato Salina

PBST – Tampão fosfato Salina Triton

PIR – Camada piramidal

RAD – Camada radiada

SLE - Vírus da encefalite de St Louis

SNC – Sistema Nervoso Central

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

TSF – “thickness sampling fraction” = altura bloco/espessura da secção

TB – Tris fosfato

TBE – Vírus da encefalite por carrapato (tick-borne encephalitis)

TBS – Tris fosfato Salina

TBST – Tris fosfato Salina Triton

TGF β – Fator de crescimento de transformação beta

WNV – Vírus West Nile

ΣQ – número de objetos contados

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
1.1. Arboviroses e encefalites virais.....	12
1.2. Reatividade astrocítica e microglial.....	15
1.3. Microglias e astrócitos durante o desenvolvimento pós-natal.....	21
1.4. Resposta imune inata na infecção pelo vírus da dengue.....	24
1.5. Objetivos.....	26
1.5.1. Geral.....	26
1.5.2. Específicos.....	26
2. Metodologia.....	27
2.1 Animais experimentais e infecção viral.....	27
2.2. Perfusão e microtomia.....	28
2.3. Imunohistoquímica.....	28
2.4. Coloração de nissl.....	29
2.5. Fotomicrografia e processamento de imagens.....	29
2.6. Procedimentos estereológicos.....	29
2.7. Morfologia astrocítica.....	33
2.8. Análise estatística.....	34
3. Resultados.....	35
4. Discussão.....	51
4.1. Astrócitos reativos e microglias ativadas na encefalite viral por dengv3.....	51
4.2. O modelo de inoculação intracerebral para indução da encefalite por dengv....	52
4.3. Estimativas estereológicas de astrócitos e microglias nas encefalites virais...	55
5. Considerações finais e conclusões.....	58
Referências bibliográficas.....	59
Anexos.....	64

1. INTRODUÇÃO

É significativa a incidência de arboviroses em países em desenvolvimento como o Brasil (TRAVASSOS DA ROSA, VASCONCELOS e TRAVASSOS DA ROSA, 1998), onde mais de 500.000 casos de dengue são anualmente reportados (FAUCI, 2001).

Na Amazônia Brasileira em particular, a elevada incidência de arboviroses parece estar associada ao manejo inadequado contínuo dos ecossistemas, contribuindo para a emergência e re-emergência de várias dessas infecções, algumas se tornando importantes problemas de saúde pública regional e nacional (VASCONCELOS et al., 1991, VASCONCELOS et al., 1997, VASCONCELOS et al., 2001b).

1.1. ARBOVIROSES E ENCEFALITES VIRAIS

Os arbovírus (do inglês “ARthropod BORne VIRUS”), reúnem um conjunto de espécies virais que produzem doença em humanos de larga importância epidemiológica no mundo inteiro. Todas as arboviroses circulam entre animais selvagens e muitas delas causam doenças em humanos ou em animais domésticos de importância econômica.

Os arbovírus são mantidos na natureza em hospedeiros vertebrados, incluindo mamíferos, aves, anfíbios, répteis, assim como em hospedeiros invertebrados, como mosquitos, flebotomíneos, carrapatos, maruins, etc. (MELLOR, BOORMAN e BAYLIS, 2000). As espécies reunidas nesse grupo podem se multiplicar nos tecidos dos artrópodes e serem transmitidos, após a picada de insetos infectados, de um artrópode para outro por via vertical, um importante mecanismo para sua manutenção na natureza. A picada de um mosquito infectado pode transmitir o patógeno para os tecidos subcutâneos de onde é mobilizado para os músculos subjacentes e para a circulação onde infectam as células sanguíneas, o portal de entrada para muitas das arboviroses humanas (MELLOR, BOORMAN e BAYLIS, 2000).

Como o termo arbovírus se refere a uma classificação baseada no ciclo viral e sua relação com os artrópodes, diferentes famílias de diferentes ordens podem ter representantes entre os arbovírus. Para revisão de sua importância epidemiológica passada e presente ver (WEAVER e REISEN, 2010).

Cerca de 200 diferentes espécies de arbovírus, já foram identificadas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) até o momento, entre as mais de 10.000 cepas de vírus isoladas de seres humanos, insetos hematófagos, vertebrados-sentinela e animais silvestres. Tais números são motivo de grande preocupação pelo fato adicional que pouco é conhecido acerca desses vírus exceto pelas informações básicas produzidas pelo IEC sobre o método de isolamento, capacidade de infectar animais de laboratório e de produzir infecções agudas (VASCONCELOS et al., 1991).

Continua desconhecido o real envolvimento de muitos desses arbovírus em doença humana, pois apenas 32 deles já foram descritas como tal. Dentre essas enfermidades se destacam quatro (Dengue, Febre amarela, Oropouche e Mayaro) que são muito importantes para a saúde pública, por serem doenças graves com potencial para gerar epidemias com considerável impacto econômico e social (VASCONCELOS et al., 2001a, WHITLEY e GNANN, 2002). Associada a tais doenças estão às encefalites virais sub-letais. Muitas viroses de diferentes famílias são denominadas neurotrópicas por sua propensão a infectar células do sistema nervoso central causando doenças severas que incluem as meningites, as encefalites e as meningoencefalites. As encefalites se referem à inflamação do parênquima, as meningites à inflamação das leptomeninges, reservando-se o termo meningoencefalites para as inflamações envolvendo parênquima e leptomeninges.

As encefalites sub-letais após infecções virais tem sido reconhecidas como indutoras de alterações comportamentais e imunológicas representando uma proporção significativa das deficiências neurológicas incapacitantes, principalmente em países pobres (JOHNSTON e HAUSER, 2008).

Dentre as viroses neurotrópicas que causam infecções agudas em humanos encontram-se o vírus da encefalite japonesa (JEV), West Nile (WNV), vírus da encefalite eqüina Venezuelana, vírus da encefalite Californiana, vírus da Dengue (DENV), vírus da febre amarela, vírus da encefalite de St Louis (SLE), vírus da encefalite de Murray Valley (MVE), vírus da encefalite por carrapato (tick-borne encephalitis – TBE), vírus Kunjin, vírus da poliomielite, vírus coxsackie, echovírus, paramixovírus (causando sarampo e rubéola), vírus influenza, vírus da raiva, varicella-zoster, citomegalovírus, herpes simplex e Epstein-Barr vírus, ver (CHAKRABORTY et al., 2010).

A Dengue é uma arbovirose de alta prevalência nos países tropicais onde o mosquito vetor *Aedes aegypti*, está presente. A doença humana associada à infecção viral em sua forma benigna (não hemorrágica) está associada a mais de 100 milhões de casos por ano que se somam a outros 250.000 da forma hemorrágica, sobretudo nas regiões tropicais do planeta onde vivem sob risco mais de 2,5 bilhões de pessoas (GUZMAN et al., 2010).

No Continente Americano em particular o vírus da dengue tem gerado hiperendemias que parecem associadas ao fato de que múltiplos sorotipos circulam de forma simultânea (GUBLER, 2002, CORDEIRO et al., 2007).

Uma série de descrições sistemáticas recentes tem associado com mais frequência à infecção por Dengue, à ocorrência de encefalites, encefalomiélites disseminadas, mielites transversas, síndrome de Guillain Barré, paralisia de nervos cranianos (PANCHAROEN e THISYAKORN, 2001, SEET, LIM e WILDER-SMITH, 2006, SOARES et al., 2006, BRITO et al., 2007, DOMINGUES et al., 2008).

No Brasil em particular foi demonstrado que em região onde a doença induzida pelo vírus da dengue é endêmica ela responde por 47% dos casos registrados de encefalites (SOARES et al., 2011). Embora tenha sido sugerido que tais síndromes neurológicas possam ser consequência de alterações metabólicas induzidas pela infecção, resposta inflamatória exacerbada, invasão do SNC pelo vírus ou a combinação em maior ou menor proporção desses elementos, grande parte dos mecanismos fisiopatológicos dessas entidades clínicas permanecem por ser esclarecidos (DOMINGUES et al., 2008).

Assim torna-se relevante e indispensável estudar o impacto da doença infecciosa sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) produzido pelo vírus da dengue para desenvolvermos capacidade de enfrentar o desafio multidimensional imposto pela epidemia em curso. É esperado que os estudos dedicados a investigar a fisiopatologia da doença neural associada ao vírus da dengue contribuam com peças de informação essenciais para orientar políticas de saúde pública relacionadas.

No presente trabalho investigamos a ativação microglial e a astrocitose reativa subsequente à encefalite viral experimental induzida pelo vírus da dengue (DENV) durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso central em camundongos suíços albinos neonatos. A razão da escolha do camundongo neonato está associada ao

fato de que as formas mais severas da infecção por dengue ocorrem principalmente em crianças (JAIN e CHATURVEDI, 2010).

1.2. REATIVIDADE ASTROCÍTICA E MICROGLIAL

'...What is the function of glial cells in neural centers? The answer is still not known, and the problem is even more serious because it may remain unsolved for many years to come until physiologists find direct methods to attack it'
(CAJAL, 1995)...

Com estas palavras proféticas Santiago Ramon y Cajal começa o seu tratado sobre a glia em seu livro “Histologia do Sistema Nervoso (KETTENMANN e VERKHRATSKY, 2008). Ironicamente a questão formulada por ele em 1913 (CAJAL, 1913) permanece por ser respondida em sua totalidade nos dias de hoje apesar de que muitos conceitos associados às funções gliais no SNC emergiram durante esse período.

Microglias e astrócitos no SNC são agora reconhecidos como participantes ativos em numerosas condições patológicas. As microglias em particular são identificadas como sendo os macrófagos do sistema nervoso central, mantendo em cérebros saudáveis, um fenótipo distinto, que é induzido por moléculas que são expressas ou secretadas por neurônios e astrócitos circunjacentes.

Essa situação fenotípica microglial erroneamente denominada quiescente (em oposição à ativada) é em grande parte assim mantida pela barreira hemato-encefálica que exclui certos componentes séricos do contato com o parênquima cerebral. As microglias parecem continuamente ativas e seus processos exploram e investigam o microambiente local de forma permanente. De fato imagens recentes de microscopia a laser de duplo fóton demonstram isso quando revelam que as microglias movem constantemente seus braços altamente ramificados em torno da superfície das células e no fluido intersticial a sua volta (Figura 1).

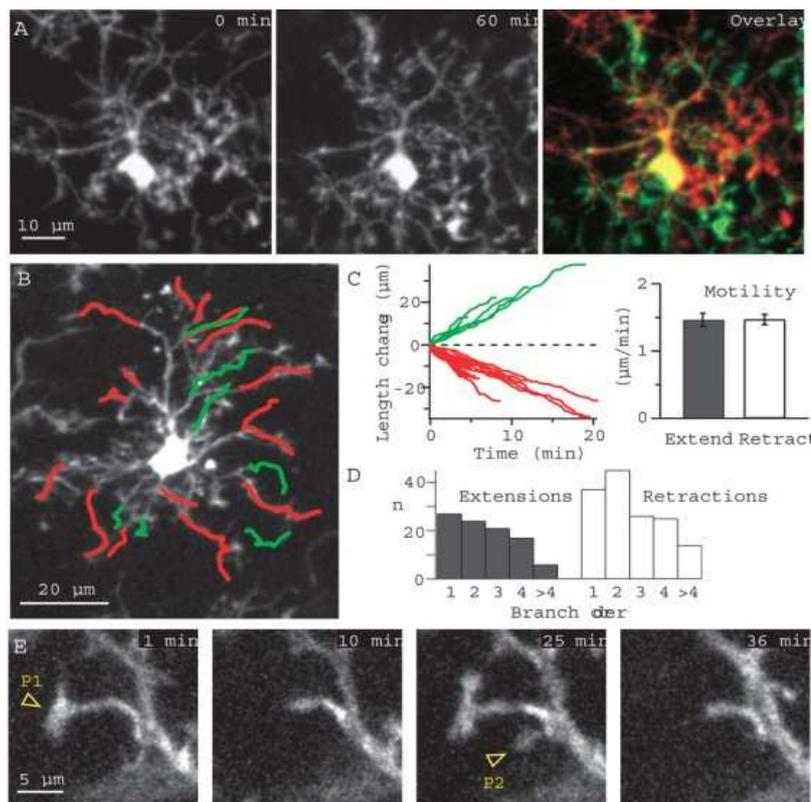


Figura 1. Células microgliais são altamente ativas em cérebros saudáveis. Os processos microgliais são vistos como emitindo protrusões de formas variáveis formando bulbos terminais que são sucedidas por retrações. Tais protrusões aparecem e desaparecem repetidas vezes em vários locais ao longo de processos principais e nas extremidades dos terminais. Frequentemente essa atividade de protrar e retrair permanece por vários minutos antes que ocorram protrusão e retração em outro processo. A velocidade desses turnover varia de 0.6 a 4.1 $\mu\text{m}/\text{min}$ e o número de locais exibindo retrações e protrusões em cada célula parecem constantes. Adaptado de (NIMMERJAHN, KIRCHHOFF e HELMCHEN, 2005).

Em poucas horas os processos microgliais podem efetivamente fazer contato com todas as superfícies situadas dentro de seu território. Além disso, evidências recentes demonstraram ainda que os processos microgliais em contacto com a bainha astrocítica em torno do endotélio podem selar rapidamente pontos de ruptura da barreira hematoencefálica (DAVALOS et al., 2005, NIMMERJAHN, KIRCHHOFF e HELMCHEN, 2005, RAIVICH, 2005) ver Figura 2.

Finalmente foi demonstrado que as microglias podem fazer contatos com sinapses normais ou da zona de penumbra de uma região isquêmica sugerindo que elas possam contribuir para a homeostase sináptica em condições normais ou alteradas (DAVALOS et al., 2005).

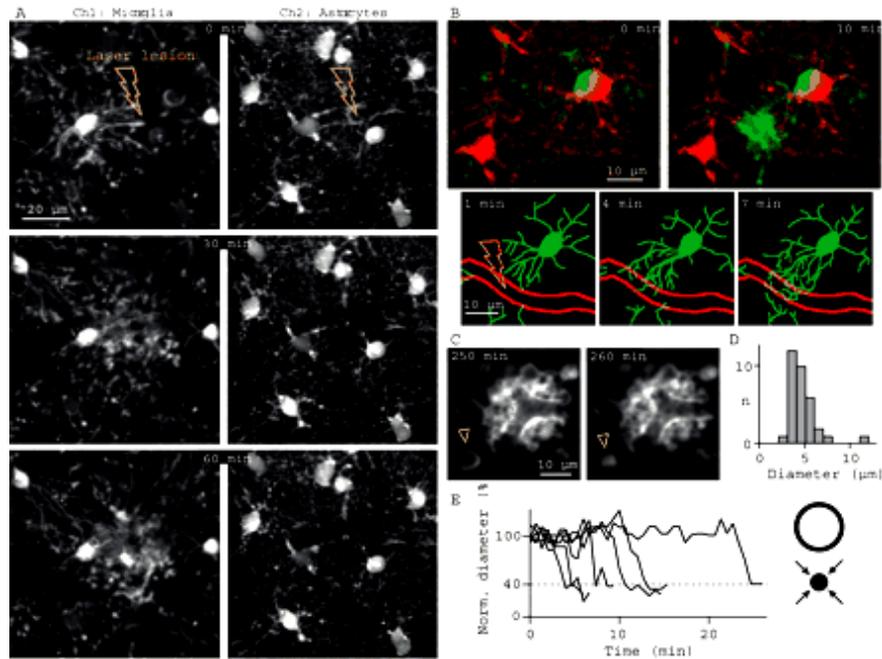


Figura 2. As microglias são rapidamente ativadas após uma lesão na barreira hematoencefálica. (A) Imagens fluorescentes de células microglioais (Ch1) e astrócitos contracolorados com SR101 (Ch2) antes, 30 min e 60 min após uma microlesão induzida por laser. O vaso sanguíneo interrompido é visto em Ch2 (seta amarela indica o sítio da lesão). (B) Reparo rápido da parede do vaso. (Acima): desenho sobreposto da microglia (em verde) e astrócito em vermelho antes e 10 minutos após a lesão. (Abaixo) Morfologia microglial em tempos intermediários mostrando movimento rápido de seus processos na direção do vaso sanguíneo lesado (contorno em vermelho; seta amarela indica o sítio da lesão). (C) Processos de microglia ativada no sítio da lesão cerca de 4 h após o dano. Vários engolfamentos esféricos são visíveis na vizinhança do vaso lesionado. As cabeças de seta apontam um engolfamento colapsado em poucos minutos (D) Histograma da distribuição de 33 engolfamentos após a lesão. (E) Esquerda: Exemplo do curso temporal do colapso dos engolfamentos esféricos. Os diâmetros estão normalizados para o valor inicial. Direita: Diagrama esquemático do colapso de um engolfamento. Adaptado de (NIMMERJAHN, KIRCHHOFF e HELMCHEN, 2005).

Em situação normal elas se apresentam em todas as regiões do SNC de forma organizada com ramificações em todas as direções e sem sobreposição, definindo domínios ou territórios; essas células normalmente têm suas funções inflamatórias reguladas para baixo por conta de numerosas influências inibitórias no microambiente que as circunda e que são produzidas em sua maioria por neurônios (RANSOHOFF e PERRY, 2009).

Entretanto elas podem mudar rapidamente seus fenótipos em resposta a qualquer distúrbio da homeostase do sistema nervoso passando a ser referidas como microglias ativadas com base na mudança de sua morfologia ou na expressão de antígenos em sua superfície (RANSOHOFF e PERRY, 2009).

A retração dos processos microgliais é aparente durante a neurodegeneração e neuroinflamação e está fortemente correlacionada com sua transformação funcional para o estado pró-inflamatório ou ativado.

As alterações morfológicas associadas à ativação (Figura 3) consistem: na aparência amebóide, com processos citoplasmáticos encurtados e mais espessos, e um corpo celular arredondado representando um contínuo de estágios de ativação que para fins didáticos podem ser classificados em inicial, intermediário e avançado e são acompanhadas pelo aumento da expressão de genes envolvidos em respostas imunes (ZIELASEK & HARTUNG, 1996).

Além da mudança morfológica, a ativação microglial também é caracterizada pela indução da liberação de várias moléculas, tais como marcadores mielóides, citocinas, radicais livres e óxido nítrico (STREIT & KREUTZBERG, 1988; BECHMANN & NITSCH, 1997; RAIVICH et al., 1999; STREIT et al., 1999).

A ativação da célula microglial pode ocorrer em resposta a variados estímulos, tais como lesões, isquemia e processos inflamatórios, levando a microglia a assumir um fenótipo ativado associado à proliferação, migração para o local da lesão, fagocitose das células infectadas e em processo de morte celular e liberação de fatores neurotóxicos e neurotróficos (POWER & PROUDFOOT, 2001).

A ativação está estreitamente relacionada com o desenvolvimento da severidade das doenças e o padrão espaço-temporal de sua ativação é distinto quando comparado ao de astrócitos. De fato, durante a progressão das doenças do SNC as microglias são ativadas mais cedo do que os astrócitos promovendo a ativação daqueles (LIU, TANG e FENG, 2011).

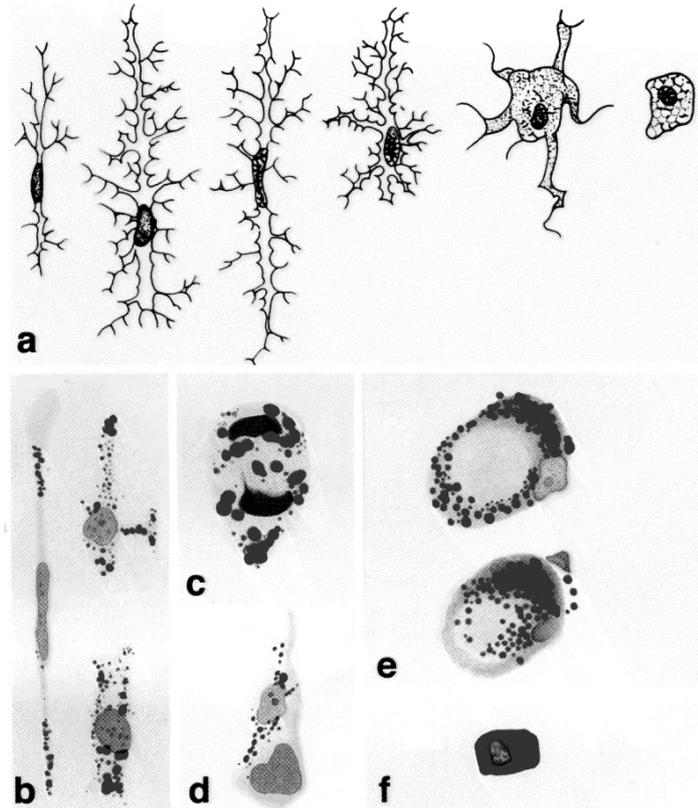


Figura 3. Morfologia da microglia. (a) Microglia não ativada. Da esquerda para direita a transformação progressiva de uma microglia na sua forma não ativada em ativada que apresenta em seu estágio terminal a forma de um fagócito. (b–f) Fenótipos ativados de microglia. (b) Microglia em bastão, (c) em divisão e (d) satélites perineuronais. (e and f) Fagócitos com lipídios não digeridos. Adaptado de (KREUTZBERG, 1996).

Os astrócitos, as células mais numerosas do SNC, estão associados a uma variedade de papéis funcionais dentre os quais a manutenção da homeostase neural, regulando o meio iônico, a concentração de neurotransmissores, oferecendo suporte metabólico e nutricional e participando do acoplamento neurovascular, barreira hematoencefálica e defesa imunológica do SNC (VERKHRATSKY e PARPURA, 2010).

A Figura 4 ilustra as características morfológicas de células astrocíticas não ativadas e reativas como parte da resposta inflamatória do hospedeiro adulto.

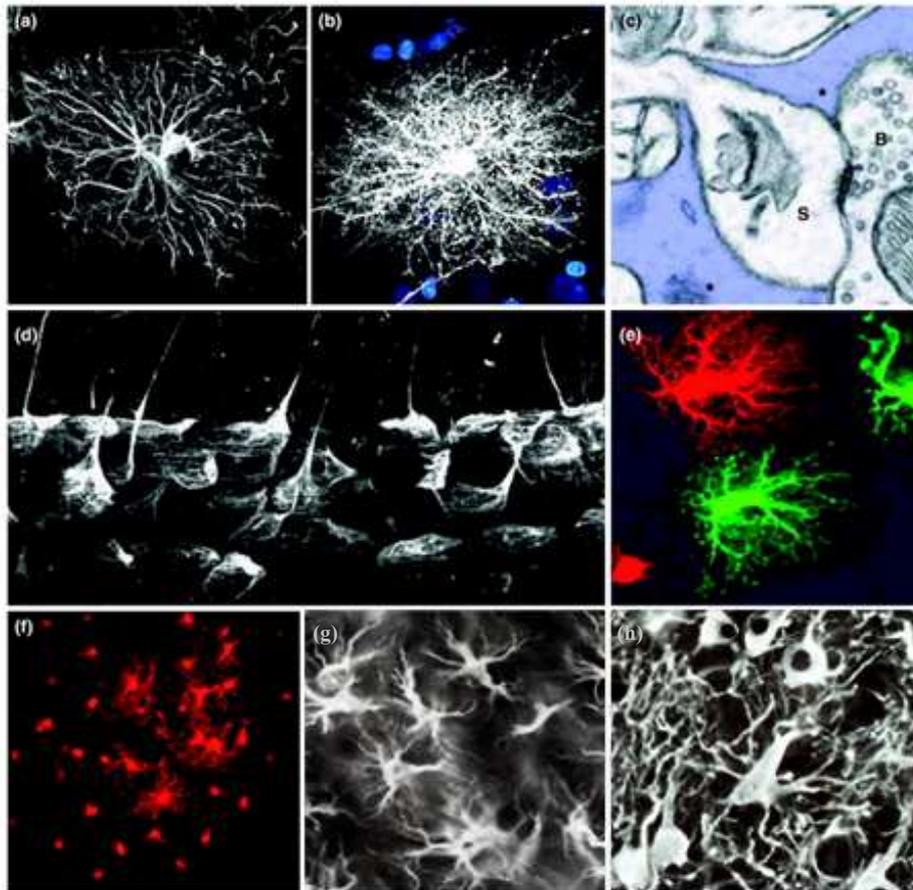


Figura 4. Características morfológicas de astrócitos. (a) Imunomarcção do cérebro humano para GFAP mostra que os astrócitos estendem numerosos processos em sua forma quiescente (não ativada). (b) Injeção intracelular de corante fluorescente revela que o astrócito humano exibe uma rede complexa de finos processos. Os núcleos estão corados em azul por DAPI que se fixa ao DNA nuclear. (c) Processos astrocíticos (em azul, marcado por um asterisco) envolvendo uma sinapse para ilustrar o terceiro elemento que compõe a sinapse tripartite tal como revelado por microscopia eletrônica de transmissão de cérebro de camundongo (S, espinha; e B, botão sináptico). (d) Pés astrocíticos são processos especializados em estreito contacto com os vasos sanguíneos cobrindo quase toda sua extensão (imunomarcção para GFAP em tecido cerebral humano). (e) Astrócitos vizinhos injetados intracelularmente com dois fluorocromos diferentes para ilustrar seus domínios não superpostos (domínios astrocíticos). (f) Acoplamento astrocítico revelado com injeção intracelular de biocitina (vermelho) injetada em um único astrócito em fatias de cérebro de camundongos resultando na difusão do traçador na rede de conexões astrocíticas através de junções em fenda (gap junctions). (g) Imunomarcção para GFAP na camada polimórfica do giro dentado do camundongo infectado por doença príon após 15 semanas. (h) Astrócitos reativos estão hipertrofiados e mostram processos imunomarcados para GFAP mais espessos na camada polimórfica do giro dentado após 18 semanas de neurodegeneração crônica induzida por doença príon em comparação a astrócitos não reativos na mesma região de animal com 15 semanas (g). Adaptado de (ALLAMAN, BÉLANGER e MAGISTRETTI, 2011, BORNER et al., 2011).

Os astrócitos ativados não somente facilitam a ativação de microglias distantes do sítio primário da lesão como também inibem sua atividade. Nessa intercomunicação participam a interleucina 1, o trifosfato de adenosina (ATP) e o fator de crescimento de transformação beta (TGF β) (LIU, TANG e FENG, 2011). Essa ativação parece ser um processo multidimensional com ações proliferativas e fagocíticas tanto quanto da liberação de citocinas e fatores de crescimento (KETTENMANN e VERKHRATSKY, 2008).

As transformações dos astrócitos em células ativadas afetam a função neural e contribuem para o desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas, assim como, para processos isquêmicos e o dano neuronal; para revisão ver (LIU, TANG e FENG, 2011).

A contribuição astrocítica para a resposta inflamatória é um dos pontos de maior interesse para o presente trabalho. Nesse sentido é importante ressaltar que os astrócitos possuem um programa de defesa altamente conservado ao longo da evolução descrito como astrocitose reativa, que em grande extensão revela o potencial fisiopatológico da astroglia.

A astrocitose reativa é disparada em uma grande variedade de circunstâncias patológicas sendo essencial para limitar a extensão do dano e para a reconstrução da região lesada com recuperação da função neural (VERKHRATSKY e PARPURA, 2010). Sendo assim, os astrócitos parecem desempenhar um duplo papel no SNC inflamado não somente aumentando a resposta imune, adiando a resolução do processo em curso, mas também limitando a inflamação através da inibição da microglia ativada (LIU, TANG e FENG, 2011).

1.3. MICROGLIAS E ASTRÓCITOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

Tendo em vista que o presente trabalho investiga o impacto de uma infecção viral intracerebral durante o desenvolvimento é importante rever o papel de microglias e astrócitos durante esse período.

Os locais onde se concentram as células microgliais e os astrócitos durante o desenvolvimento são pistas importantes para desvendar sua contribuição funcional

nesse período. Com essa perspectiva é bom revisitar suas localizações e funções durante o desenvolvimento.

As células microgлияis tendem a se concentrar em áreas de morte celular, na vizinhança de vasos sanguíneos em desenvolvimento, na lâmina marginal (que contém fascículos axonais em desenvolvimento), em regiões acelulares e em estreita proximidade à glia radial (PONT-LEZICA et al., 2011).

A relação entre a presença de microgлияs e morte neuronal durante o desenvolvimento foi correlacionada com a presença de células apoptóticas (WAKSELMAN et al., 2008, RIGATO et al., 2011) e imagens in vivo tomadas em embrião de zebrafish revelaram que as microgлияs engolfam neurônios apoptóticos com seus processos, (PERI e NUSSLEIN-VOLHARD, 2008) e explica porque durante o aumento do número de microgлияs há redução do número de neurônios. Além disso, as microgлияs parecem participar do processo de morte celular programada dirigindo células para apoptose (WAKSELMAN et al., 2008).

As microgлияs são também encontradas em íntima associação com a rede vascular em desenvolvimento (RIGATO et al., 2011) e o reconhecimento dessa coincidência estimulou a investigação de seu papel na angiogênese, tendo sido demonstrado que a redução do número de microgлияs está associada com uma rede vascular esparsa (FANTIN et al., 2010, RYMO et al., 2011). Por outro lado, quando aparecem as primeiras zonas marginais durante o desenvolvimento, as microgлияs são vistas com morfologia alterada em íntima associação com os feixes axonais, onde se organizam em paralelo permanecendo assim até sua diferenciação em microgлия adulta (HERBOMEL, THISSE e THISSE, 2001).

De forma coerente foi demonstrado no corpo caloso que as microgлияs engolfam fibras amielínicas durante o período de eliminação axonal pós-natal (INNOCENTI, CLARKE e KOPPEL, 1983).

Também tem sido demonstrada a presença de materiais pré- e pós-sinápticos no interior de processos microgлияis confirmando que as microgлияs podem engolfar ativamente sinapses em processo de degeneração (PAOLICELLI et al., 2011) e que para isso as microgлияs em desenvolvimento expressam o receptor do complemento CR3 sendo essa uma característica essencial para a eliminação de sinapses indesejáveis marcadas com a proteína C1q (STEVENS et al., 2007, PERRY e O'CONNOR, 2008).

Em resumo, a remoção eficiente e seletiva de células apoptóticas, sinapses e axônios distais como parte do processo de remodelagem que acompanha o desenvolvimento do sistema nervoso têm em comum algumas características e estas incluem componentes do complemento C1q e C3 que são utilizados para marcar sinapses supranumerárias para remoção por células fagocíticas microgliais (PERRY e O'CONNOR, 2008).

Finalmente a associação estreita entre a glia radial e as microglias durante o desenvolvimento sugere possível interação entre essas células e de fato, mais recentemente demonstrou-se que o óxido nítrico produzido pela síntese do óxido nítrico não neuronal (NOS-2) um potente marcador inflamatório produzido por macrófagos e microglia regula a diferenciação da glia radial (BECHADE et al., 2011).

No hipocampo em particular, durante o desenvolvimento, neurônios e astrócitos são gerados de forma seqUencial pela glia radial. Nos estágios iniciais, as células precursoras produzem neurônios e funcionam como substrato para a migração neuronal. Em torno do nascimento uma vez tendo se completada a neurogênese a glia radial começa a se diferenciar em astrócitos e a expressar daí em diante a proteína fibrilar ácida- GFAP (KRIEGSTEIN e ALVAREZ-BUYLLA, 2009).

Durante o período pós-natal inicial os astrócitos amadurecem e mudam sua morfologia, sua conectividade e suas propriedades eletrofisiológicas. Os astrócitos imaturos são pobremente ramificados até a segunda semana pós-natal quando adquirem sua morfologia estrelada, tendo sido sugerido que o óxido nítrico possivelmente sintetizado nos macrófagos e microglias participa dos mecanismos subjacentes a essas transformações (BECHADE et al., 2011).

No presente trabalho, sobrepôs-se a esse delicado processo de desenvolvimento uma infecção viral intracerebral para investigar de que forma a gliogênese em curso, associada ao desenvolvimento, seria afetada pela encefalite. Para isso utilizou-se abordagem quantitativa sem viés baseada no fracionador óptico estimando o número de microglias e astrócitos no hipocampo e giro denteado, no sétimo dia pós-natal. Compararam-se as estimativas do camundongo inoculado com homogenado cerebral contendo o vírus com àquelas realizadas nos animais controle que receberam homogenado cerebral não infectante.

A escolha de quantificar o número de microglias ativadas e astrócitos foi feita baseada no fato de que sua ativação está estreitamente relacionada com o

desenvolvimento da severidade das doenças. A escolha das regiões de interesse para quantificação foi baseada em dois motivos: o primeiro relacionado ao fato de que o hipocampo e o giro denteado estão situados distantes do sítio de inoculação viral onde a lesão traumática produzida pela agulha induz reatividade astrocítica e ativação microglial e o segundo associado ao fato de que estudos prévios em camundongos adultos infectados por DENV por via intracerebral demonstram o comprometimento hipocampal (AMARAL et al., 2011).

1.4. RESPOSTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE.

Os RNA vírus podem ser classificados de acordo com o sentido da polaridade de seu RNA em vírus com RNA com sentido negativo (negative-sense), vírus com RNA com sentido positivo (positive-sense) ou com sentido duplo (ambisense) e de acordo com o número de fitas ou cadeias, em simples e dupla (KUHN et al., 2002).

Os vírus com seu RNA de polaridade positiva devido a sua similaridade com o mRNA podem sofrer translação imediatamente na célula hospedeiro enquanto que aqueles com RNA de polaridade negativa são complementares ao mRNA e precisam ser primeiro convertidos em RNA de polaridade positiva por uma RNA polimerase antes da translação. Assim o RNA purificado de um RNA vírus de sentido positivo pode causar infecção diretamente enquanto que o de sentido negativo não é infectante em si mesmo devendo ser transcrito antes de poder causar infecção (KUHN et al., 2002).

O vírus da dengue é um RNA vírus de fita única de sentido positivo composto por três proteínas estruturais designadas Proteína C, M e E dispostas na região mais interna do vírus (core), na membrana (M) e no envelope (E) viral. A glicoproteína E, que é exposta na superfície da partícula viral é responsável pela maioria das funções biológicas do vírus, incluindo sua aderência à membrana e específica fusão às membranas dos endossomos de pH ácido. A glicoproteína E é também o principal antígeno que induz a fabricação de anticorpos neutralizantes (KUHN et al., 2002).

A maioria dos indivíduos infectados pelo vírus da dengue são assintomáticos ou desenvolvem doença febril conhecida como dengue clássica. Os sinais e sintomas da doença incluem febre alta, dores musculares, dor retro-orbital, dores articulares, vômito e perda de apetite durante três a sete dias (TDR/WHO., 2009).

Uma parcela pequena (3%) dos indivíduos infectados desenvolve doença grave com hemorragia e/ou choque hipovolêmico designadas dengue hemorrágica e choque síndrome induzido por dengue. A fase aguda da doença grave é similar a doença febril até que subitamente os pacientes desenvolvem síndrome de permeabilidade vascular severa, trombocitopenia, hemorragias focais ou generalizadas e distúrbios da coagulação associados ao choque e a morte (TDR/WHO., 2009).

A infecção das células do hospedeiro pelo vírus da dengue começa pela ligação do vírus aos receptores de membrana. A entrada do vírus na célula é mediada por endocitose mediada por receptores na qual a mudança conformacional da glicoproteína E, leva a fusão do vírus com a membrana do endossomo (KUHN et al., 2002).

A replicação do vírus está associada com estruturas de membrana induzidas pelo vírus dentro do citoplasma das células infectadas e os primeiros passos da replicação ocorrem em associação com as membranas do retículo endoplasmático (NAVARRO-SÁNCHEZ, DESPRÈS e CEDILLO-BARRÓN, 2005).

As células intersticiais dendríticas e as células NK (Natural Killer cells) são ativadas nas fases iniciais da infecção constituindo a primeira linha de defesa inata contra o vírus. Em associação com a resposta imune humoral envolvendo o interferon, as citocinas e as quimiocinas, as células dendríticas e as NK provavelmente desempenham papel chave na iniciação da resposta imune adaptativa, que de forma subsequente ativará células efetoras incluindo linfócitos auxiliares B e T e linfócitos T citotóxicos (ROTHMAN, 2010).

A desregulação das células dendríticas e NK parece contribuir para exacerbação da progressão da doença durante a infecção por dengue facilitando a replicação viral e a resposta exacerbada das células inflamatórias que abrigam o vírus com liberação aumentada de citocinas, extravasamento de plasma, choque e eventual óbito (NAVARRO-SÁNCHEZ, DESPRÈS e CEDILLO-BARRÓN, 2005, ROTHMAN, 2010).

De fato avanços tecnológicos recentes na análise de células T DENV específicas, aplicados a amostras de sangue, antes, durante e após infecções agudas por dengue, demonstraram que essas células de memória ao serem expostas a outro sorotipo viral respondem com produção exacerbada de citocinas, agravando os sinais e sintomas que levam à doença síndromica associada ao choque e/ou à hemorragia e que a expansão do

número de tais células está correlacionada com o grau de severidade da doença em curso (ROTHMAN, 2010).

Para estimar o número de astrócitos totais e o número de microglias ativadas ou não, aplicamos o fracionador óptico, um método estereológico de alta confiabilidade e precisão que tem sido usado em uma variedade de estudos para determinar o número de células em múltiplas regiões do sistema nervoso central (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991, BONTHIUS et al., 2004).

O fracionador óptico não é afetado pelas mudanças histológicas, retração, ou expansão induzida por dano tecidual, uma particularidade importante quando o alvo do estudo são as doenças cerebrais (GUNDERSEN e JENSEN, 1987, WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991, WEST, 2002).

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. GERAL:

Investigar quantitativamente as alterações neuropatológicas, associados à resposta imune inata, em modelo murino neonato de encefalite viral induzida por inoculação do vírus da dengue, sorotipo 3 genótipo III, por via intracerebral.

1.5.2. ESPECÍFICOS:

1) Implementar o camundongo suíço albino neonato como modelo experimental para investigar a resposta imune inata nas encefalites virais produzidas pelo vírus da Dengue.

2) Investigar e quantificar a resposta glial no hospedeiro neonato através de estimativas estereológicas do número de astrócitos e de microglias no hipocampo e giro denteado.

2. MÉTODOS

Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo comitê institucional para cuidados com animais do Instituto Evandro Chagas. Usamos camundongos albinos suíços neonatos obtidos a partir do biotério do Instituto Evandro Chagas e tratados de acordo com o "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH).

2.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS E INFECÇÃO VIRAL

Oito camundongos lactentes de dois dias de idade da espécie *Mus musculus* e variedade suíça albina foram infectados por inoculação intracerebral com flavivirus (DENV 3, genótipo III). O mesmo número de animais foi utilizado como controle (não infectado) e tratados nas mesmas condições dos infectados.

Para obtenção da suspensão contendo DENV neurovirulento, camundongos suíços albinos neonatos foram inoculados por via intracerebral com 0,01 ml de suspensão contendo cepa de DENV-3, obtida na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (IEC), a partir de casos de meningoencefalite por dengue. Os animais com sinais clínicos da doença foram congelados em um freezer -70°C , seus cérebros retirados, homogeneizados e diluídos a uma concentração final de 0,001% em uma solução salina fosfato-tamponada contendo penicilina e estreptomicina. O homogenado foi centrifugado (10.000 rpm) a 4°C por 15 minutos.

Dez microlitros da suspensão foi inoculada em 8 camundongos com 2 dias de idade, via IC, sendo usada a dose infectante de 3×10^{-3} DL50/0,01 ml. O mesmo número de animais foi inoculado por via IC com homogenado cerebral normal não infectante (sem vírus). Depois da inoculação, os animais são observados diariamente até o 7º dia pós inoculação (dpi) quando são sacrificados e processados para análise microscópica.

A carga viral contida na suspensão DENV neurovirulento, utilizada para inoculação dos animais infectados, foi confirmada por técnica de PCR em tempo real e para isso extraiu-se o RNA viral do sobrenadante de culturas de células C6/36 infectadas seguindo as instruções do fabricante (Qiagen, Hilden, Germany).

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado usando um kit comercial (SuperScript III Platinum SYBR® Green On-step qRT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o ABI Prism 7500 Real time PCR System (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA).

A reação foi realizada em volume final de 25µl contendo 5µl de RNA viral (1-2ng/ µl), 0.5µl de Superscript III RT Platinum Taq Mix, 0.2µM de cada primer para detecção do vírus da dengue (DENV)(DOS SANTOS et al., 2008), 12.5µl da solução molecular fluorescente 2x SYBR e 1µl do corante ROX. A amplificação foi obtida em ciclo térmico de 50°C por 20min, 95°C por 5min, 45 ciclos de 95 °C por 15s, 55°C por 40s e 72 °C por 30s. A curva de fusão (*melting curve*) foi calculada durante o período de incubação de 60 - 90 °C com velocidade de captura de 0.2 °C/s. Cada amostra foi analisada em duplicata.

A quantificação por SYBR qRT-PCR foi expressada em cópias do genoma/ml baseada na curva padrão construída com os valores extraídos da curva de amplificação do RNA extraído das células C6/36 infectadas com DENV-3 da variedade BH692808 (estoque: 3.1×10^6 cópias genômicas/ml) diluída na faixa de 10^{-1} a 10^{-6} .

2.2. PERFUSÃO E MICROTOMIA

Aos 7 dpi os camundongos doentes são anestesiados por hipotermia e perfundidos por via intra-cardíaca com solução salina heparinizada e paraformoldeído 4% utilizando-se uma bomba de perfusão. Após a craniotomia, os cérebros são seccionados em plano axial na espessura de 100µm em vibrátomo (MICROM, modelo HM 650 V). As secções de cada animal são recolhidas serialmente em quatro amostras igualmente representativas de todo o cérebro de forma sistemática, sendo que em cada amostra havia em torno de 8 secções, para posterior processamento por imunohistoquímica.

2.3. IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi realizada imunohistoquímica anti-GFAP, marcador da Proteína Ácida Fibrilar Glial presente nos astrócitos, e anti-IBA-1, marcador de canais de cálcio ionizado adaptado a moléculas apenas expressa nas células microgliais e macrófagos.

As imunohistoquímicas foram realizadas em amostras de todos os cérebros infectados e controles. Os protocolos seguidos para cada anticorpo encontram-se disponíveis em anexo.

Algumas secções foram contracoradas pela técnica de Nissl e em seguida, desidratadas e montadas com Enthelan® e lamínula.

Tabela 2: Especificação dos anticorpos e diluição utilizados nas reações imunohistoquímicas.

Anticorpo	Fabricante	Diluição
Anti-GFAP	Millipore Corporation (USA)	1:400
Anti-Iba1	Wako Chemicals (USA)	1:500

2.4. COLORAÇÃO DE NISSL

A contracoloração de Nissl foi realizada em todas as secções imunomarcadas para GFAP e IBA-1 utilizadas para a contagem estereológica. O cresil violeta marca em violeta todos os limites nucleares das células encefálicas, permitindo delinear sem ambigüidade os contornos das regiões de interesse (BOLAM, 2005).

O processo de contracoloração encontra-se disponível em anexo.

2.5. FOTOMICROGRAFIA E PROCESSAMENTO DE IMAGENS

As fotomicrografias foram obtidas com uma câmara digital acoplada a um microscópio óptico (NIKON, Eclipse 80i) com objetiva de 10X, 20X e 40X para ilustração das áreas de interesse e objetiva de 100X (NA 0.7) para ilustração dos objetos de interesse. O brilho e o contraste das imagens foram ajustados através do software Adobe Photoshop 7.0.1 (San Jose, CA, USA).

2.6. PROCEDIMENTOS ESTEREOLÓGICOS

Todas as estimativas estereológicas foram iniciadas com a delineação, no plano horizontal, das regiões de interesse, onde os limites do hipocampo e giro denteado eram de fácil delimitação. A figura 5 ilustra as regiões e as camadas de interesse em objetiva de 10x.

O Corno de Amon 2 foi delimitado conjuntamente com o Corno de Amon 1, devido CA2 ser de difícil separação morfológica de CA1 no animal neonato. Para fins de contagem o campo de CA1/CA2 compreendeu a região situada entre o Corno de

Amon 3 e o Subiculum. Note que a camada piramidal na transição com CA3 se desorganiza tornando-se mais espessa do que em CA1-CA2. No limite com o subiculum a camada piramidal expande-se rapidamente tornando-se igualmente desorganizada.

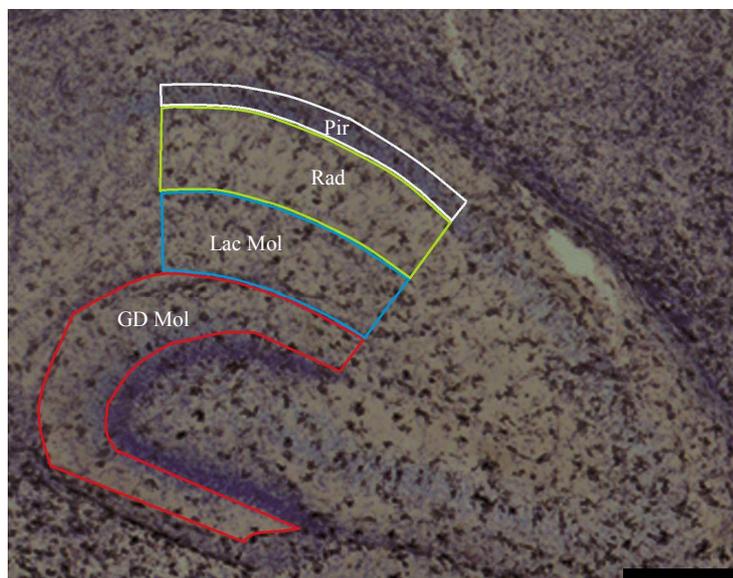


Figura 5. Fotomicrografia de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para IBA-1 e contrainformada em violeta pela reação de Nissl para ilustrar a laminação na região de interesse (GDMol = camada molecular do giro dentado; Lac Mol = camada lacunosum molecular, Rad = Camada Radiada e Pir = Camada Piramidal). Escala = 250µm.

Em todas as secções histológicas analisadas foi realizada a delimitação das camadas de interesse com uma objetiva de pequeno aumento, 4× em um microscópio óptico (NIKON, Eclipse 80i) (Nikon, Japan) equipado com uma platina motorizada (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA).

O sistema foi acoplado a um computador usado para armazenar e analisar as coordenadas dos eixos x, y, and z de pontos digitalizados. Foi utilizado para as contagens um microscópio óptico de campo claro com objetiva PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2µm; Nikon, Japan), com vídeo-câmera (Microfire, Optronics), que permitiu o registro e transporte dos arquivos de imagem para um computador onde softwares residentes realizaram o processamento. O programa estimou o número total de células baseado na probabilidade amostral obtida através de contagens aleatórias e sistemáticas previamente mencionadas.

O procedimento de contagem foi iniciado com a geração automática de caixas de contagem virtuais pelo programa Stereo Investigator em cada um dos pontos da matriz de contagem que representam intersecções da sonda estereológica com o plano onde

estava situada a fatia. Para isso, o experimentador alimenta o programa definindo as dimensões da caixa, da matriz de contagem e da fração amostral de secções. A escolha dessas dimensões e da fração amostral foi feita em ensaio preliminar (por tentativa e erro) até que o coeficiente de erro de uma fatia individual fosse adequado para obter resultados médios para o conjunto de secções e tivesse um baixo coeficiente de erro (<0.05).

Em cada caixa de contagem foram marcados os objetos de interesse (microglias e astrócitos), esses objetos marcados em cada caixa geraram informações para o programa acerca do número e da posição dos elementos contidos em cada caixa. A partir dessas informações colhidas sistematicamente na fração de secções eleitas para contagem, o programa estimou o número esperado de objetos de interesse na estrutura inteira.

Em cada local de contagem, a espessura da secção foi cuidadosamente avaliada com a objetiva de grande aumento e o foco fino do microscópio foi usado para definir a posição no eixo z da cada célula marcada. Devido à variação de espessura e da distribuição de células em cada secção, o número total de objetos de interesse foi contado em todas as camadas celulares que entraram em foco em cada local de contagem, portanto a estimativa do número de células foi ponderada tomando em consideração a espessura do corte em cada local.

Foram contados todos os objetos que entraram em foco dentro da caixa de contagem e adicionados ao número total de objetos marcados, desde que se encontrassem inteiramente dentro da sonda estereológica de contagem ou cruzando o plano permitido, sem tocar o plano proibido (GUNDERSEN e JENSEN, 1987).

O programa se encarrega de distribuir cada caixa de contagem de forma aleatória e sistematicamente, dentro de uma grade definida pelo experimentador. As grades de contagem foram adaptadas para atingirem um coeficiente de erro aceitável (CE). Para isso foi adotado o coeficiente de Scheaffer previamente utilizado e validado por outros autores (GLASER e WILSON, 1998).

O nível de erro aceitável para as estimativas estereológicas foi definido como a razão entre o erro intrínseco introduzido pela metodologia e o coeficiente de variação da amostra (GLASER e WILSON, 1998, SLOMIANKA e WEST, 2005). O coeficiente de erro que expressa a precisão na estimativa do número de células, foi considerado apropriado neste trabalho quando atingiu um valor de $CE \leq 0.05$, porque a variância

introduzida pelo procedimento contribui pouco para a variância observada no grupo (GLASER e WILSON, 1998, SLOMIANKA e WEST, 2005). Os parâmetros experimentais estabelecidos em experimentos pilotos foram aplicados uniformemente a todos os animais.

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

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

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

Onde:

N – número total de objetos

ΣQ – número de objetos contados

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

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

A tabela 2, abaixo, demonstra os valores estereológicos para as 4 camadas de interesse.

Tabela 2: Parâmetros estereológicos utilizados no programa StereoInvestigator.

<i>Camadas</i>	<i>a(caixa)</i>	<i>A(X,Y)</i>	<i>Zona de guarda</i>	<i>Altura do bloco</i>
GD Mol	40 x 40	50 x 50	2 μ m	10 μ m
CA1-2 Piramidal	80 x 80	80 x 80	2 μ m	10 μ m
CA1-2 Lacunoso Molecular	80 x 80	90 x 90	2 μ m	10 μ m
CA1-2 Radiada	80 x 80	90 x 90	2 μ m	10 μ m

2.7. MORFOLOGIA ASTROCÍTICA

Para a morfologia dos astrócitos utilizou-se semelhantemente ao trabalho estereológico, microscópio óptico (NIKON, Eclipse 80i) com platina motorizada e

conversores análogo-digitais (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para conversão digital da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto. Esse sistema é acoplado a microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (Neurolucida, MicroBrightField, Williston, VT, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambigüidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas reconstruções, a objetiva de 4.0 x era substituída por outra PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2 μ m; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais realizadas.

A reconstrução tem capacidade de fornecer dados para uma análise qualitativa e quantitativa e permite também a determinação da topografia dos elementos digitalizados. A reconstrução 3D permite a verificação da distribuição espacial de arborizações astrocíticas, morfologia de ramos, número de suas ramificações, número de nodos, comprimento de segmentos, oferecendo uma ferramenta analítica de alta precisão para estudos de morfometria fina.

As reconstruções dos astrócitos foram feitas com critérios estabelecidos para se evitar viés, por tanto, foram escolhidos astrócitos cuja morfologia estava representada em maior número, em campos semelhantes da camada molecular, tanto nos animais controle como nos animais infectados, dentro de uma série de seções selecionadas. A camada molecular foi escolhida por ser o alvo principal das projeções eferentes do córtex entorrinal para CA1 (VAN GROEN, MIETTINEN e KADISH, 2003) além de compor juntamente com a camada molecular do giro denteado as margens da fissura hipocampal. Esta última atravessada por vasos calibrosos tem sido descrita como porta de entrada das alterações hipocampais induzidas por infecções virais (DINIZ et al., 2008)

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações realizadas entre os 2 grupos experimentais foram a análise paramétrica, adotando-se o teste Teste T, duas amostras independentes bi-caudal, com intervalo de confiança estabelecido em 95% ou 99% ($p < 0.05$ ou $p < 0.01$).

3. RESULTADOS

Desenvolvemos modelo experimental murino neonato para investigação das manifestações neurológicas da DENGUE com foco na encefalite viral produzida pela variedade associada à encefalites humanas.

Todos os animais infectados desenvolveram sinais de encefalite e morreram aos 7 dpi e a análise imunohistoquímica revelou sinais de inflamação e gliose reativa.

Estudamos as alterações neuropatológicas induzidas pela infecção experimental com ênfase na quantificação da resposta inflamatória cerebral do hospedeiro neonato através da detecção de microglias não ativadas e ativadas e astrócitos reativos ou não em cérebros de camundongos que receberam uma única inoculação com o homogenado cerebral infectado com o vírus.

Nossos resultados revelaram que após a inoculação, os animais infectados apresentam marcada alteração astrocítica reativa (Figura 5E) quando comparados aos animais controles (Figura 5B), com evidências de atividade fagocítica de corpos picnóticos corados pela técnica de Nissl (Figura 5F).

De fato a expressão aumentada de GFAP nos animais infectados em comparação ao animal controle foi confirmada pela análise de astrócito típico reconstruído em 3 dimensões. As médias do comprimento, área e volume de seus ramos foram: (Inf = $6,38 \pm 0,9$ vs Cont = $4,34 \pm 0,33\mu\text{m}$), área (Inf = $14,80 \pm 2,03$ vs Cont $6,21 \pm 0,60 \mu\text{m}^2$) e volume (Inf $4,36 \pm 0,88$ vs Cont $1,23 \pm 0,24\mu\text{m}^3$), teste t bi-caudal $p < 0,05$. Em contraposição o número de ramos por astrócito é maior nos animais controle do que nos animais infectados, particularmente os ramos de ordem superior (ver dendrograma na Figura 7). Estudos sistemáticos empregando reconstrução tri-dimensional estão presentemente em curso para caracterização morfométrica das mudanças reunindo um maior número de animais e de amostras para validação de tais diferenças. A figura 7 é uma representação serial de fotomicrografias dos astrócitos para ilustração das mudanças morfológicas associadas à infecção com suas respectivas reconstruções tri-dimensionais e dendrogramas.

Alterações morfológicas semelhantes são encontradas para microglia (Figura 8) de forma disseminada no parênquima cerebral e nas leptomeninges dos animais neonatos infectados, coerente com o quadro neuropatológico de meningoencefalite.

Na figura 9, ilustram-se os diferentes fenótipos morfológicos encontrados nos animais infectados, chamando atenção especial para as células macrofágicas fagocitando corpos picnóticos corados pela técnica de Nissl (9C e 9E).

Na figura 10, em baixo (A,C), e grande aumentos (B, D) é ilustrado o hipocampo imunomarcado para IBA-1. As imagens sugerem que os animais controle (A, B) em relação aos infectados (C, D) apresentam menor número de células microgliais alteradas em sua morfologia.

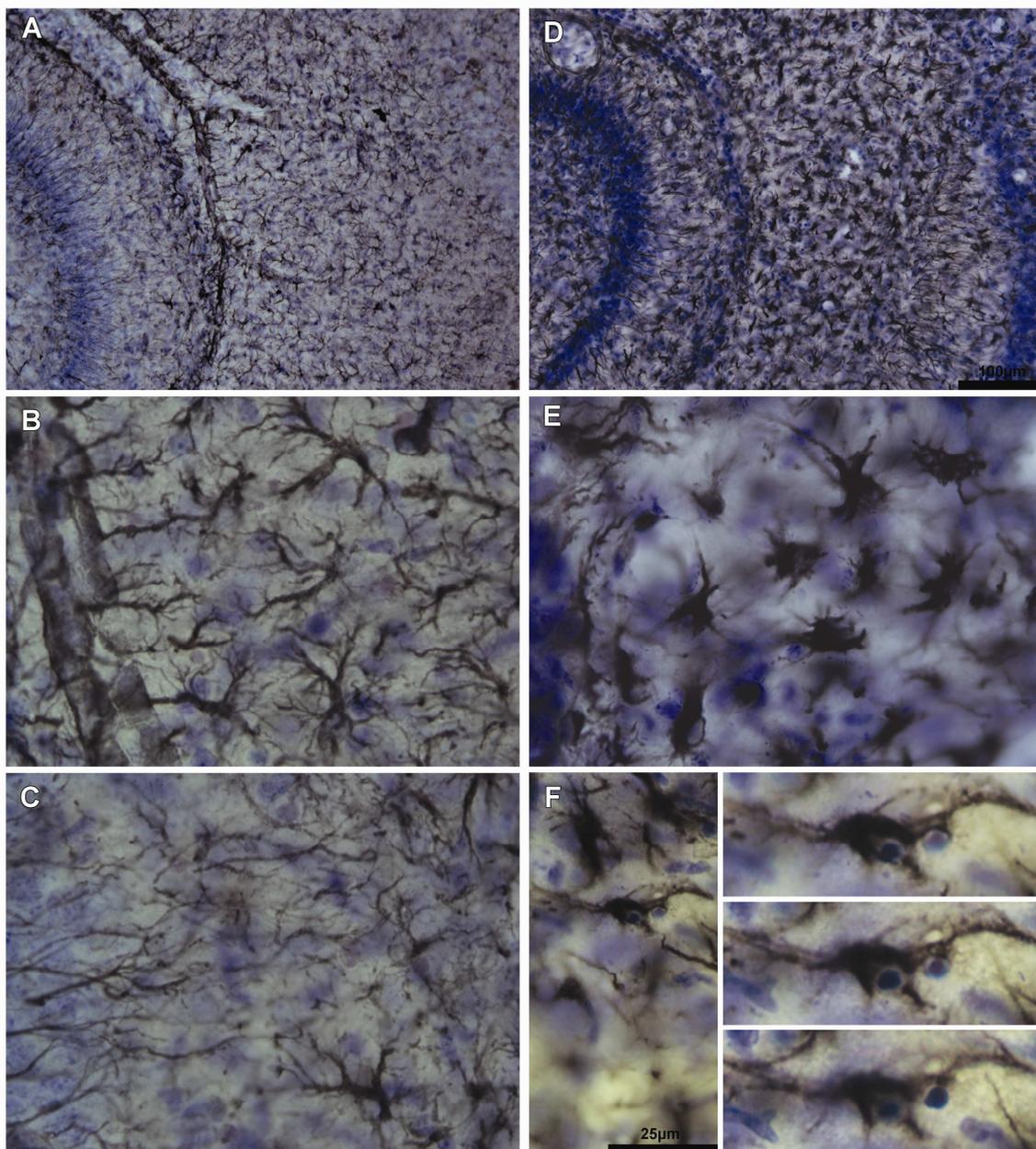


Figura 6. Fotomicrografias de secções horizontais do hipocampo imunomarcadas para GFAP para ilustrar os astrócitos e as camadas de interesse (GDMol e Lac Mol de CA1-2) dos camundongos albinos Suíços neonatos. A-C (controle e D-F (infetados com Dengue) em objetivas de 20x (A e D) e 100x (B, C, E e F). Note que os astrócitos do animal infectado apresentam hipertrofia dos corpos celulares e encurtamento das ramificações. Em (F) a ampliação digital da imagem em diferentes planos de foco permite observar um astrócito “envolvendo” dois corpos picnóticos contracolorados em violeta pela reação de Nissl.

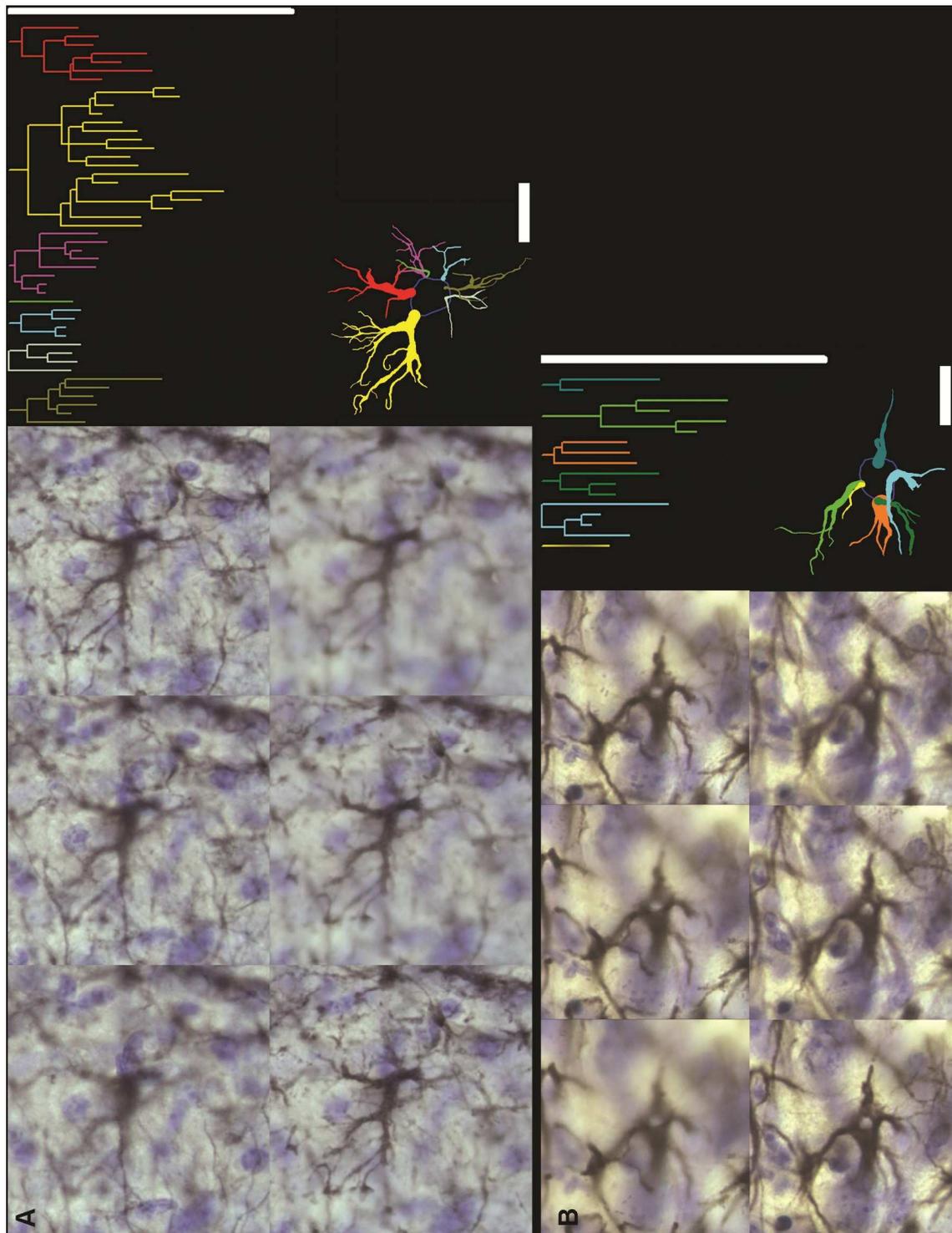


Figura 7. Astrócitos da camada molecular do giro denteado de camundongos controle (A) e infectado (B). Série de fotomicrografias em diferentes planos de foco ilustrando as mudanças morfológicas induzidas após a infecção viral. As fotos foram tomadas de regiões equivalentes da camada molecular do giro denteado. Note que os astrócitos do animal infectado apresentam ramos mais longos, mais espessos e menos numerosos do que os do animal controle sugerindo uma maior expressão de GFAP restrita a ramos mais proximais. Escalas das fotomicrografias e reconstrução tridimensional = 12.5 μ m e dendrograma.

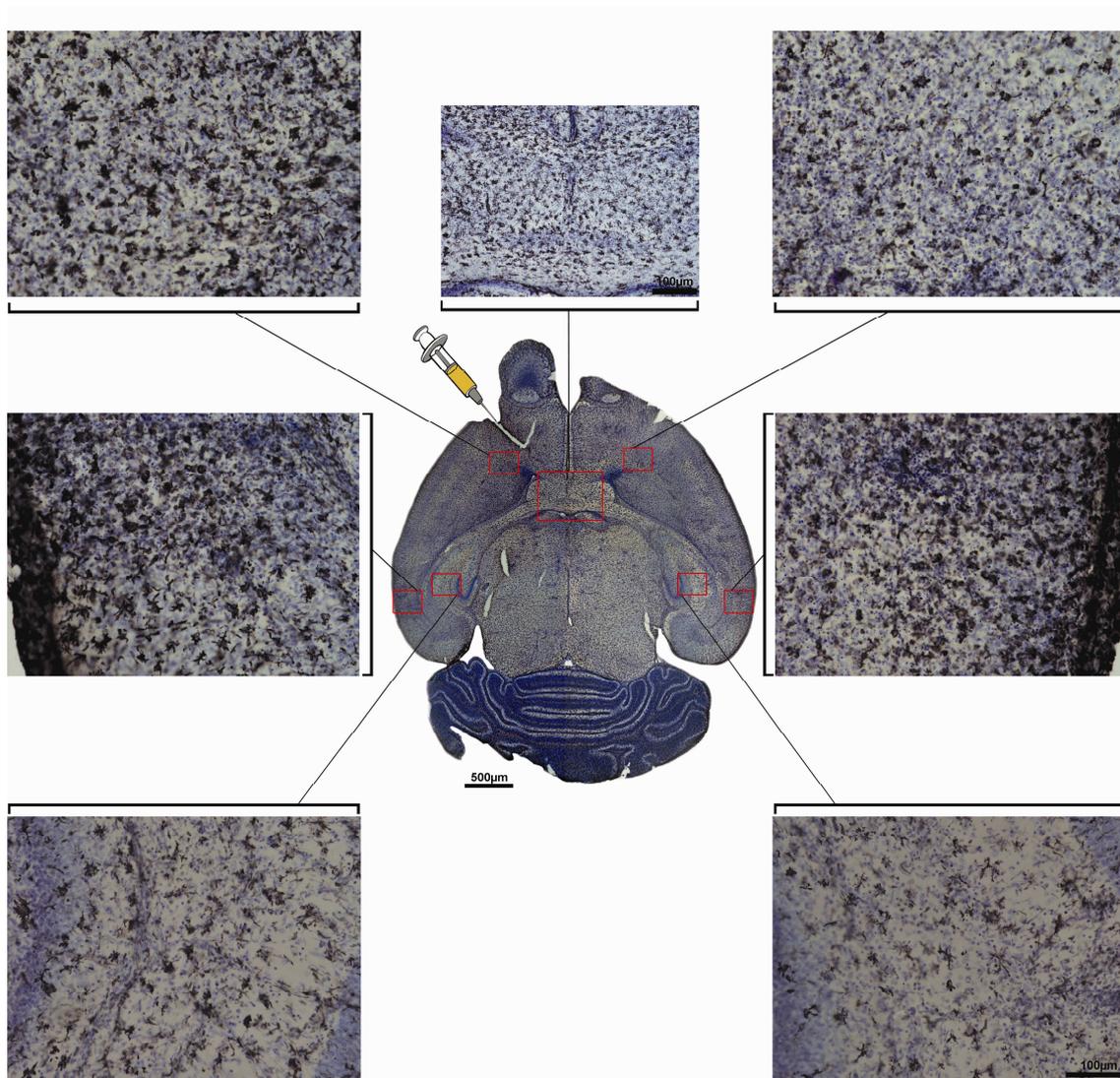


Figura 8. Fotomicrografias mostrando o mapa encefálico da resposta inflamatória microglial pelas células imunomarcadas para IBA-1, sendo o sítio de lesão indicado pela agulha (região frontal). As fotos referem-se à região frontal, córtex temporal e as camadas molecular do giro denteado, lacunoso molecular, estrato radiado e piramidal de CA1-2 respectivamente, sendo as fotos a esquerda ipsilaterais e as à direita, contralateral à inoculação. O retângulo central indica a região septal na fotomicrografia em baixo aumento.

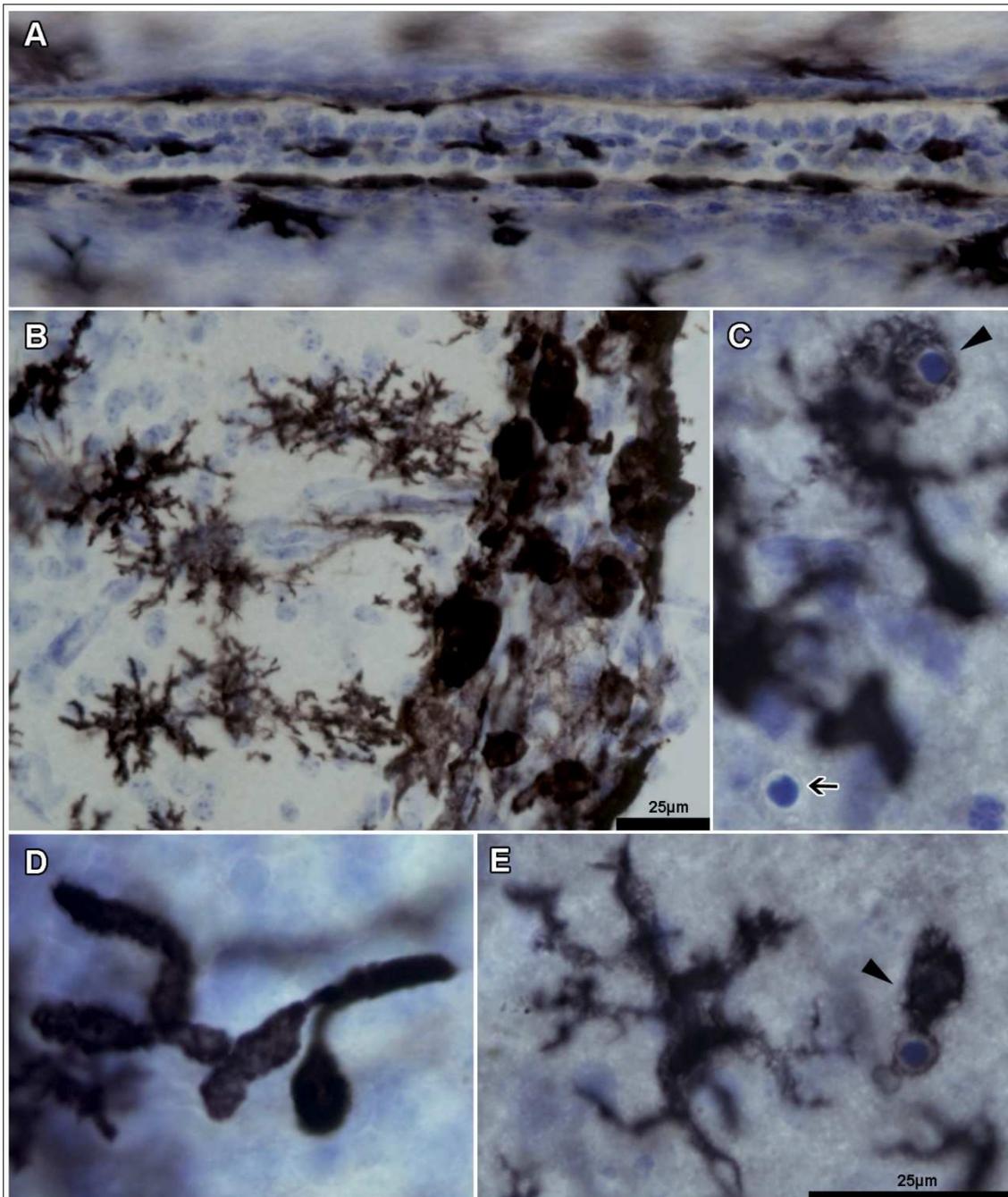


Figura 9. Fotomicrografias de diferentes tipos e morfologias celulares imunomarcadas para IBA-1 em um animal infectado. Em (A) podem ser visualizadas varias macrófagos periféricos com morfologia achatada no interior de um capilar sanguíneo. Macrófagos periféricos também podem ser encontrados com morfologia arredondada nas meninges (B). Em (C e E) macrófagos (indicados pela ponta de seta) fagocitam corpos picnóticos (seta em C) frequentes somente nos animais infectados. (D) Microglias em formato de bastão também podem ser encontradas nos animais infectados com dengue.

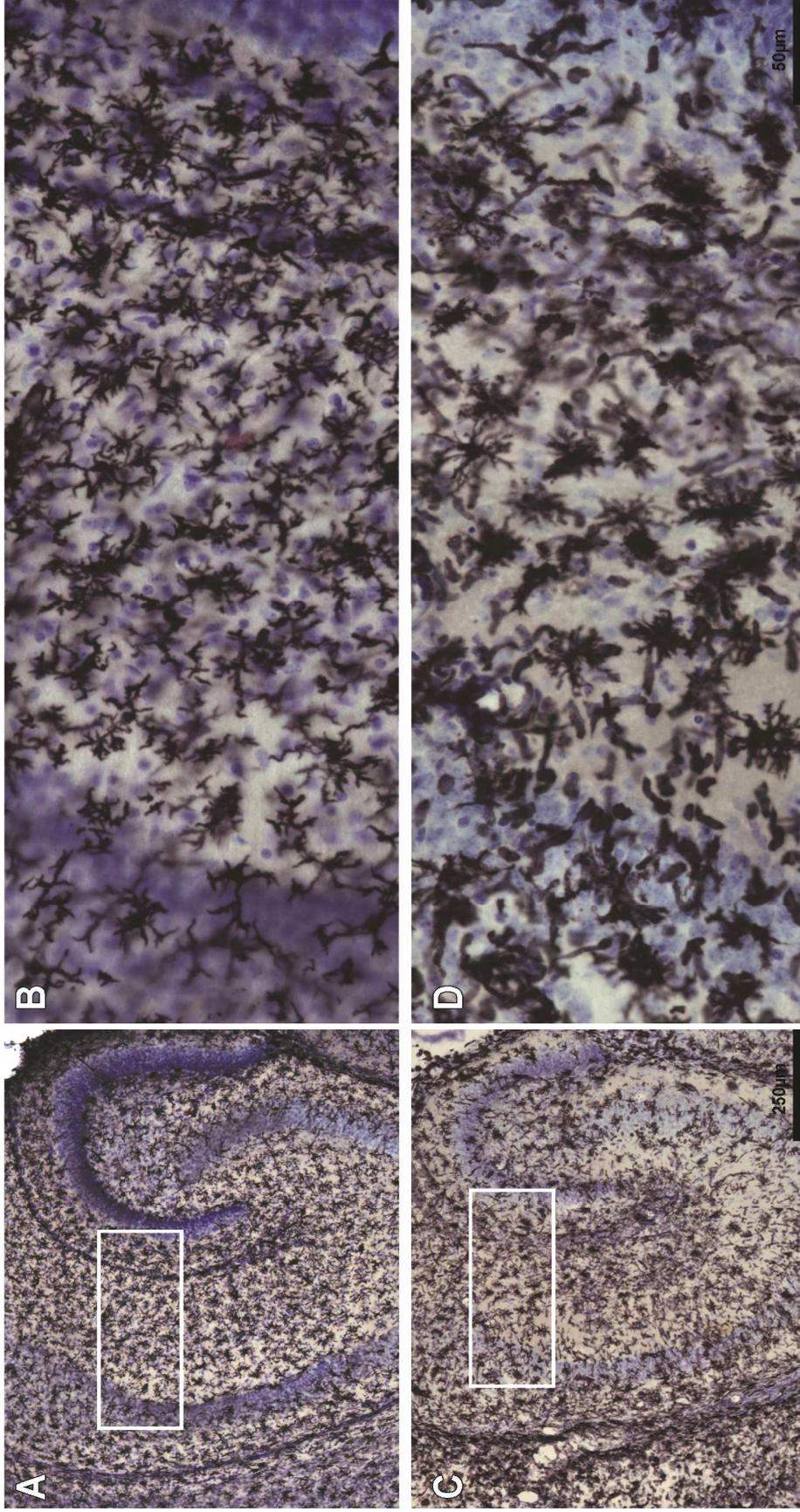


Figura 10. Fotomicrografias de seções horizontais do hipocampo imunomarcadas para IBA-1 para ilustrar as microglias e as camadas de interesse (Molecular do Giro Dentado, Lacunoso Molecular, Radiado e Piramidal de CA1-2) em camundongos albinos suíços neonatos. A-B (controles) e C-D (infectados com Dengue) em objetivas de 10x e 40x respectivamente.

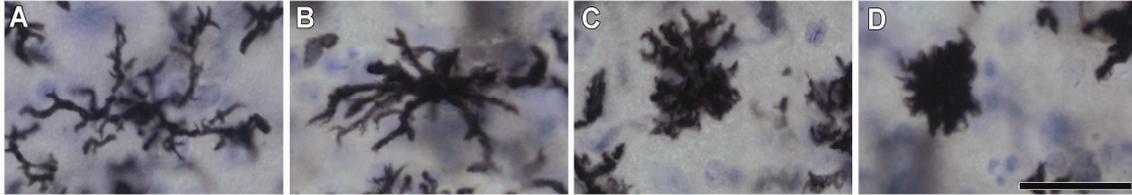


Figura 61. Fotomicrografias mostrando os diferentes fenótipos morfológicos das células microgliais imunomarcadas para IBA-1; A: microglia quiescente (não ativada); B - D: gradiente de ativação microglial progressivo com o maior nível de ativação em D.

Para estimar o número de microglias ativadas e totais distinguiram-se dois marcadores no momento da contagem o primeiro dedicado ao estágio de ativação ilustrado na figura 11, em D, e o segundo aos demais (A-C). Esses achados quantitativos empregando o fracionador óptico são ilustrados nas tabelas de 3 a 8. Nelas estão presentes os parâmetros experimentais e os resultados médios de contagens das microglias de cada lâmina de interesse do giro denteado e hipocampo para cada grupo experimental.

Tabela 3: Valores paramétricos utilizados no protocolo de contagem e a estimativa total de astrócitos na camada molecular do giro denteado.

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>Nº de Caixas</i>	<i>Nº de Secções</i>	ΣQ
Cont 5	40 x 40	50 x 50	0.64	0.38	0.40	453	4	715
Cont 6	40 x 40	50 x 50	0.64	0.53	0.33	559	4	1417
Cont 7	40 x 40	50 x 50	0.64	0.71	0.31	617	4	1437
Cont 12	40 x 40	50 x 50	0.64	0.43	0.40	505	4	776
Inf 1	40 x 40	50 x 50	0.64	0.58	0.50	405	4	920
Inf 2	40 x 40	50 x 50	0.64	0.71	0.50	359	4	776
Inf 5	40 x 40	50 x 50	0.64	0.63	0.44	307	4	776
Inf 6	40 x 40	50 x 50	0.64	0.56	0.44	435	4	945
<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	
Cont 5	26.25 \pm 6.00	11693.29	0.038	Inf 1	17.14 \pm 1.28	9894.18	0.033	
Cont 6	18.83 \pm 5.39	16510.21	0.030	Inf 2	13.99 \pm 0.44	6790.6	0.040	
Cont 7	14.1 \pm 0.75	12576.82	0.029	Inf 5	15.90 \pm 1.27	7614.66	0.037	
Cont 12	23.21 \pm 4.20	11312.22	0.040	Inf 6	17.89 \pm 1.13	10581.26	0.032	
Média	20.60	13023.14	0.034	Média	16.24	8720.18	0.036	
D.P.	5.29	2384.30		D.P.	1.70	1806.23		
CV²		0.034		CV²		0.043		
CE²		0.001		CE²		0.00		
CE²/CV²		0.035		CE²/CV²		0.030		
CVB²		0.032		CVB²		0.042		
CVB² (% CV²)		96.51%		CVB² (% CV²)		97.01%		

CV coeficiente de variação² = (Desvio padrão/ Média)²; CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica).

Tabela 4: Valores paramétricos utilizados no protocolo de contagem e a estimativa total de astrócitos na camada lacunoso molecular de CA1-2.

<i>Animais</i>	<i>a(caixa) (μm^2)</i>	<i>A(X,Y) (μm^2)</i>	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>Nº de Caixas</i>	<i>Nº de Secções</i>	<i>ΣQ</i>
Cont 5	60 X 60	90 X 90	0.44	0.35	0.40	146	4	670
Cont 6	60 X 60	90 X 90	0.44	0.60	0.33	176	4	1266
Cont 7	60 X 60	90 X 90	0.44	0.71	0.31	157	4	772
Cont 12	60 X 60	90 X 90	0.44	0.56	0.40	146	4	789
Inf 1	60 X 60	90 X 90	0.44	0.60	0.50	141	4	835
Inf 2	60 X 60	90 X 90	0.44	0.72	0.50	130	4	856
Inf 5	60 X 60	90 X 90	0.44	0.69	0.44	129	4	885
Inf 6	60 X 60	90 X 90	0.44	0.58	0.44	154	4	706
<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	
Cont 5	28.28 \pm 9.58	17574.69	0.053	Inf 1	16.58 \pm 1.27	12400.49	0.050	
Cont 6	16.57 \pm 5.02	17565.34	0.045	Inf 2	13.88 \pm 0.64	10614.58	0.050	
Cont 7	14.02 \pm 0.33	9741.57	0.048	Inf 5	14.43 \pm 0.58	11470.68	0.050	
Cont 12	17.80 \pm 2.83	12912.29	0.046	Inf 6	17.12 \pm 1.88	10943.21	0.046	
Média	19.17	14448.47	0.048	Média	15.50	11357.24	0.049	
D.P.	6.28	3829.83		D.P.	1.59	779.79		
CV²		0.07		CV²		0.00		
CE²		0.002		CE²		0.002		
CE²/CV²		0.03		CE²/CV²		0.51		
CVB²		0.07		CVB²		0.00		
CVB² (% CV²)		96.72%		CVB² (% CV²)		48.99%		

CV coeficiente de variação ² = (Desvio padrão/ Média)²; CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica).

Tabela 5: Valores paramétricos utilizados no protocolo de contagem e a estimativa total de microglias na camada molecular do giro denteado.

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>Nº de</i> <i>Caixas</i>	<i>Nº de</i> <i>Secções</i>	ΣQ	ΣQ <i>ativada</i>	ΣQ <i>não</i> <i>ativada</i>
A	40 x 40	50 x 50	0.64	0.67	0.50	439	4	648	46	602
B	40 x 40	50 x 50	0.64	0.69	0.44	377	4	512	93	419
C	40 x 40	50 x 50	0.64	0.66	0.33	628	4	566	64	502
D	40 x 40	50 x 50	0.64	0.64	0.40	669	4	714	59	655
E	40 x 40	50 x 50	0.64	0.59	0.50	514	4	618	10	607
F	40 x 40	50 x 50	0.64	0.57	0.44	508	4	487	14	473
G	40 x 40	50 x 50	0.64	0.46	0.40	437	4	448	19	429
H	40 x 40	50 x 50	0.64	0.67	0.44	373	4	471	98	373

<i>Animais</i>	<i>Espessura da</i> <i>Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N</i> <i>ativada</i>	<i>N Não</i> <i>ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE</i> <i>ativada</i>	<i>CE não</i> <i>ativada</i>
Inf B	14.58 \pm 0.37	4679.45	849.98	3829.47	0.039	0.101	0.041
Inf C	15.11 \pm 0.30	5392.05	609.70	4782.35	0.033	0.108	0.035
Inf D	15.71 \pm 0.97	7071.67	584.35	6487.32	0.028	0.113	0.029
Inf H	14.95 \pm 0.61	4382.18	911.79	3470.39	0.037	0.095	0.041
Média	15.09	5381.34	738.96	4642.38	0.034	0.104	0.037
D.P.	0.47	1203.92	166.14	1348.80			
CV²		0.05	0.05	0.08			
CE²					0.0012	0.0109	0.0013
CE²/CV²					0.02	0.22	0.02
CVB²					0.0489	0.0397	0.0831
CVB² (% CV²)					97.68%	78.48%	98.41%

<i>Animais</i>	<i>Espessura da</i> <i>Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N</i> <i>ativada</i>	<i>N não</i> <i>ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE</i> <i>ativada</i>	<i>CE não</i> <i>ativada</i>
Cont A	14.84 \pm 0.59	5977.64	424.34	5553.30	0.035	0.131	0.037
Cont E	16.90 \pm 0.84	6539.58	105.82	6423.18	0.033	0.268	0.034
Cont F	17.53 \pm 1.21	5315.31	152.80	5162.50	0.038	0.244	0.039
Cont G	21.77 \pm 3.94	5847.22	247.98	5599.24	0.040	0.190	0.041
Média	17.77	5919.94	232.74	5684.56	0.037	0.208	0.038
D.P.	2.91	502.71	140.76	529.97			
CV²		0.01	0.37	0.01			
CE²					0.0014	0.0434	0.0014
CE²/CV²					0.19	0.12	0.16
CVB²					0.0059	0.3224	0.0073
CVB² (% CV²)					81.27%	88.14%	83.65%

CV coeficiente de variação ² = (Desvio padrão/ Média)²; CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica).

Tabela 6: Valores paramétricos utilizados no protocolo de contagem e a estimativa total de microglias na camada lacunoso molecular de CA1-2.

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>Nº de</i> <i>Caixas</i>	<i>Nº de</i> <i>Secções</i>	ΣQ	ΣQ <i>ativada</i>	ΣQ <i>não</i> <i>ativada</i>
A	60 X 60	90 X 90	0.44	0.69	0.50	143	4	478	27	451
B	60 X 60	90 X 90	0.44	0.68	0.44	101	4	421	26	395
C	60 X 60	90 X 90	0.44	0.69	0.33	151	4	348	30	318
D	60 X 60	90 X 90	0.44	0.71	0.40	170	4	498	14	484
E	60 X 60	90 X 90	0.44	0.59	0.50	142	4	390	10	380
F	60 X 60	90 X 90	0.44	0.55	0.44	130	4	337	8	329
G	60 X 60	90 X 90	0.44	0.45	0.40	138	4	279	3	276
H	60 X 60	90 X 90	0.44	0.71	0.44	101	4	268	47	221

<i>Animais</i>	<i>Espessura da</i> <i>Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N</i> <i>ativada</i>	<i>N não</i> <i>ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE</i> <i>ativada</i>	<i>CE não</i> <i>ativada</i>
Inf B	14.62 \pm 0.39	5565.55	343.72	5221.83	0.075	0.160	0.079
Inf C	14.44 \pm 0.41	4516.80	389.38	4127.42	0.050	0.167	0.053
Inf D	14.09 \pm 0.61	6253.44	175.80	6077.64	0.044	0.235	0.045
Inf H	14.09 \pm 0.28	3414.91	598.88	2816.03	0.062	0.141	0.066
Média	14.31	4937.68	376.95	4560.73	0.058	0.176	0.061
D.P.	0.27	1241.16	174.14	1410.65			
CV²		0.06	0.21	0.10			
CE²					0.0033	0.0309	0.0037
CE²/CV²					0.05	0.14	0.04
CVB²					0.0599	0.1825	0.0919
CVB² (% CV²)					94.74%	85.51%	96.11%

<i>Animais</i>	<i>Espessura da</i> <i>Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N</i> <i>ativada</i>	<i>N não</i> <i>ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE</i> <i>ativada</i>	<i>CE não</i> <i>ativada</i>
Cont A	14.51 \pm 0.98	6208.83	350.71	5858.12	0.051	0.183	0.052
Cont E	17.08 \pm 1.37	6088.00	156.10	5931.90	0.055	0.278	0.056
Cont F	18.29 \pm 0.55	5515.18	130.92	5384.25	0.058	0.353	0.058
Cont G	22.13 \pm 4.39	5338.24	57.40	5280.84	0.063	0.518	0.064
Média	18.01	5787.56	173.78	5613.78	0.057	0.333	0.057
D.P.	3.17	425.76	125.16	328.85			
CV²		0.0054	0.52	0.0034			
CE²					0.0032	0.1109	0.0032
CE²/CV²					0.60	0.21	0.96
CVB²					0.0022	0.4079	0.0001
CVB² (% CV²)					40.7%	78.67%	5.88%

CV coeficiente de variação ² = (Desvio padrão/ Média)²; CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica).

Tabela 7: Valores paramétricos utilizados no protocolo de contagem e a estimativa total de microglias no estrato radiado de CA1-2.

<i>Animais</i>	<i>a(caixa)</i> (μm^2)	<i>A(X,Y)</i> (μm^2)	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>Nº de</i> <i>Caixas</i>	<i>Nº de</i> <i>Secções</i>	ΣQ	ΣQ <i>ativada</i>	ΣQ <i>não</i> <i>ativada</i>
A	60 X 60	90 X 90	0.44	0.69	0.50	169	4	504	5	499
B	60 X 60	90 X 90	0.44	0.70	0.44	128	4	317	30	287
C	60 X 60	90 X 90	0.44	0.72	0.33	180	4	345	30	315
D	60 X 60	90 X 90	0.44	0.72	0.40	181	4	404	41	363
E	60 X 60	90 X 90	0.44	0.60	0.50	147	4	400	5	395
F	60 X 60	90 X 90	0.44	0.60	0.44	140	4	353	6	347
G	60 X 60	90 X 90	0.44	0.48	0.40	148	4	370	1	369
H	60 X 60	90 X 90	0.44	0.70	0.44	107	4	202	23	179

<i>Animais</i>	<i>Espessura da</i> <i>Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N</i> <i>ativada</i>	<i>N não</i> <i>ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE</i> <i>ativada</i>	<i>CE não</i> <i>ativada</i>
Inf B	14.28 \pm 0.63	4089.2	386.99	3702.21	0.057	0.164	0.058
Inf C	13.91 \pm 0.38	4325.88	376.16	3949.72	0.048	0.174	0.051
Inf D	13.87 \pm 0.37	5028.01	510.27	4517.74	0.046	0.161	0.050
Inf H	14.26 \pm 0.45	2604.47	296.55	2307.92	0.062	0.195	0.067
Média	14.09	4011.89	392.49	3619.40	0.053	0.173	0.056
D.P.	0.22	1019.46	88.27	938.61			
CV²²		0.06	0.05	0.07			
CE²					0.0028	0.0301	0.0032
CE²/CV²					0.04	0.59	0.05
CVB²					0.0617	0.0205	0.0641
CVB² (% CV²)					95.59%	40.52%	95.26%

<i>Animais</i>	<i>Espessura da</i> <i>Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N</i> <i>ativada</i>	<i>N não</i> <i>ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE</i> <i>ativada</i>	<i>CE não</i> <i>ativada</i>
Cont A	14.43 \pm 0.63	6533.41	64.82	6468.59	0.051	0.401	0.051
Cont E	16.80 \pm 1.57	6103.46	76.29	6027.16	0.054	0.397	0.054
Cont F	16.79 \pm 1.23	5400.98	91.8	5309.18	0.058	0.673	0.058
Cont G	20.89 \pm 5.28	6712.11	18.14	6693.96	0.058	0.905	0.058
Média	17.23	6187.49	62.76	6124.72	0.055	0.594	0.055
D.P.	2.68	583.25	31.74	610.16			
CV²		0.008	0.26	0.01			
CE²					0.0030	0.3528	0.0031
CE²/CV²					0.375	0.69	0.30
CVB²					0.005	(-0.34)	0.0069
CVB² (% CV²)					62.5%	-66.12%	70%

CV coeficiente de variação ² = (Desvio padrão/ Média)²; CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica).

Tabela 8: Valores paramétricos utilizados no protocolo de contagem e a estimativa total de microglias na camada piramidal de CA1-2.

<i>Animais</i>	<i>a(caixa) (μm^2)</i>	<i>A(X,Y) (μm^2)</i>	<i>asf</i>	<i>tsf</i>	<i>ssf</i>	<i>Nº de Caixas</i>	<i>Nº de Secções</i>	ΣQ	ΣQ <i>ativada</i>	ΣQ <i>não ativada</i>
A	80 X 80	80 X 80	1.00	0.66	0.50	141	4	259	7	252
B	80 X 80	80 X 80	1.00	0.69	0.44	126	4	279	27	252
C	80 X 80	80 X 80	1.00	0.70	0.33	152	4	302	42	260
D	80 X 80	80 X 80	1.00	0.71	0.40	155	4	196	12	184
E	80 X 80	80 X 80	1.00	0.57	0.50	143	4	219	9	210
F	80 X 80	80 X 80	1.00	0.59	0.44	135	4	221	3	218
G	80 X 80	80 X 80	1.00	0.49	0.40	128	4	164	3	161
H	80 X 80	80 X 80	1.00	0.70	0.44	98	4	268	49	219

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N ativada</i>	<i>N não ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE ativada</i>	<i>CE não ativada</i>
Inf B	14.43 \pm 0.73	1617.96	156.58	1461.38	0.029	0.080	0.029
Inf C	14.27 \pm 0.68	1733.06	241.02	1492.04	0.030	0.091	0.029
Inf D	14.16 \pm 0.81	1131.55	69.28	1062.27	0.035	0.122	0.036
Inf H	14.36 \pm 0.63	1555.85	284.46	1271.38	0.034	0.069	0.037
Média	14.31	1509.61	187.84	1321.77	0.032	0.090	0.033
D.P.	0.12	262.51	95.21	198.63			
CV²		0.03	0.26	0.02			
CE²					0.0010	0.0082	0.0011
CE²/CV²					0.03	0.03	0.05
CVB²					0.0292	0.2488	0.0215
CVB² (% CV²)					96.62%	96.82%	95.23%

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção μm</i>	<i>N</i>	<i>N ativada</i>	<i>N não ativada</i>	<i>CE</i>	<i>CE ativada</i>	<i>CE não ativada</i>
Cont A	15.2 \pm 1.87	1612.55	43.58	1568.97	0.030	0.176	0.030
Cont E	17.64 \pm 1.28	1559.36	64.08	1495.27	0.023	0.113	0.023
Cont F	17.02 \pm 1.49	1544.70	20.97	1523.74	0.019	0.138	0.019
Cont G	20.5 \pm 4.20	1321.82	24.18	1297.65	0.033	0.206	0.033
Média	17.59	1509.61	38.20	1471.41	0.026	0.158	0.026
D.P.	2.20	128.54	19.93	119.75			
CV²		0.01	0.27	0.01			
CE²					0.0007	0.0251	0.0007
CE²/CV²					0.09	0.09	0.10
CVB²					0.0066	0.2472	0.0059
CVB² (% CV²)					90.53%	90.80%	89.57%

CV coeficiente de variação² = (Desvio padrão/ Média)²; CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica).

Nas representações gráficas das contagens, ilustramos os animais controles em azul e os infectados em vermelho. No gráfico 1 temos o número de microglias totais para as quatro camadas de interesse, sendo que nos animais infectados há uma diminuição no número de células totais na camada radiada de CA1-2 quando comparados aos animais controles.

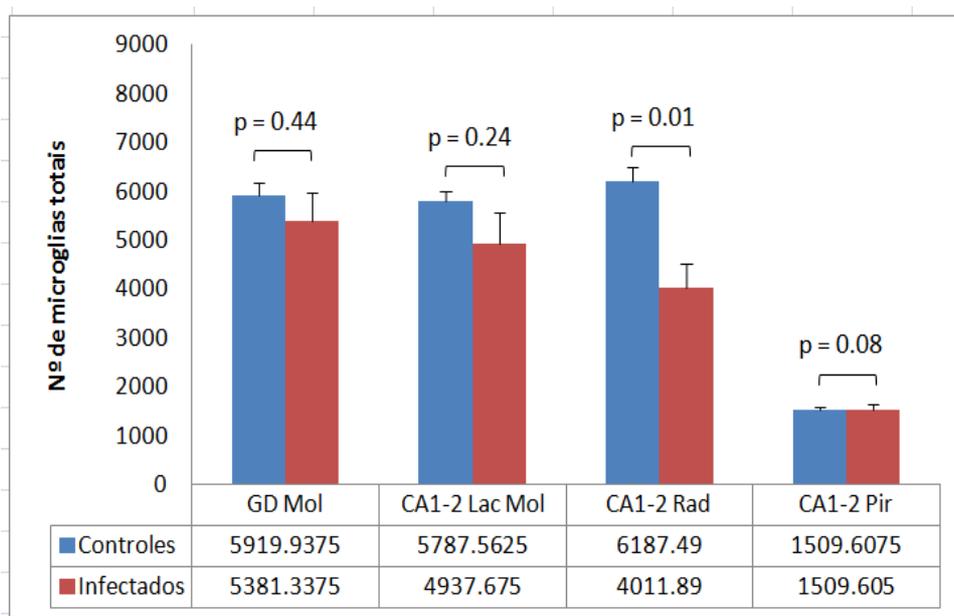


Figura 72. Estimativas para o número de microglias totais para a camada molecular do giro denteado e as camadas lacunoso molecular, radiada e piramidal de CA1-2 empregando o fracionador óptico nos diferentes grupos experimentais.

No gráfico 2 ilustramos as estimativas do número de microglias ativadas nos 2 grupos experimentais. Os animais infectados apresentam maior número de células ativadas em todas as camadas de interesse, sendo esta ativação significativa principalmente nas camadas de sinapses (GDMol e CA1-2 Rad).

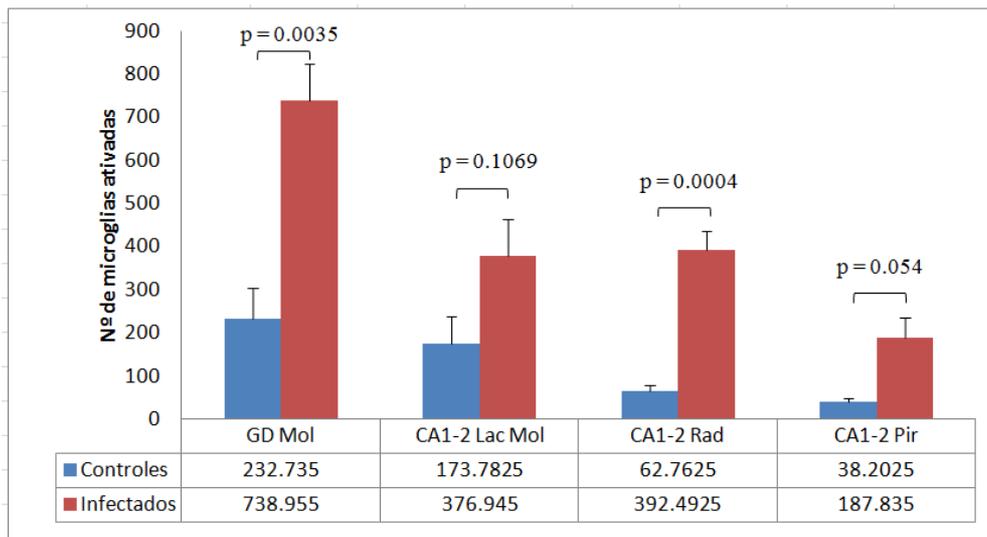


Figura 83. Estimativas para o número de microglias ativadas para as camadas molecular do giro dentado e as camadas lacunoso molecular, radiada e piramidal de CA1-2 empregando o fracionador óptico nos diferentes grupos experimentais.

No gráfico 3 apresentamos as estimativas estereológicas para o número de astrócitos na camada molecular do giro dentado e lacunoso molecular de CA1-2, havendo uma diminuição significativa no número de astrócitos dos animais infectados quando comparados com os controles.

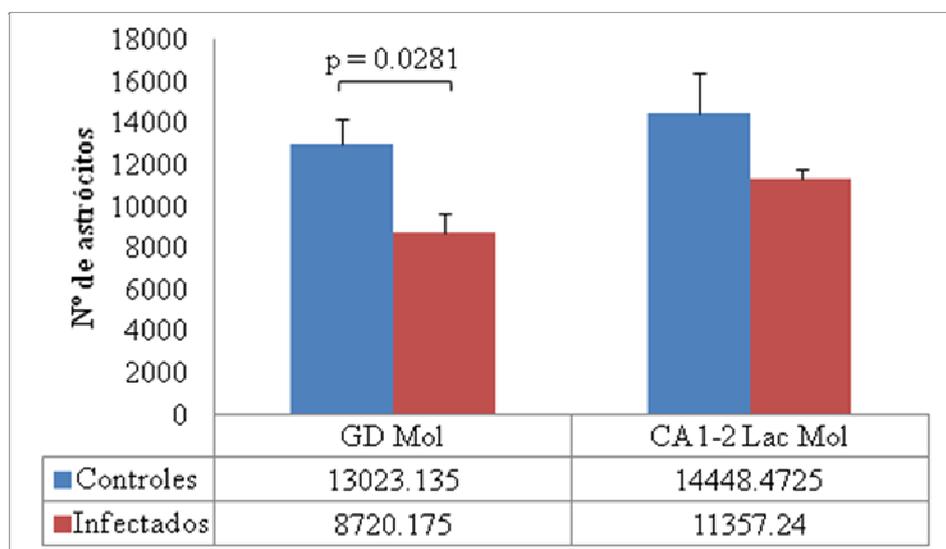


Figura 94. Estimativas para o número de astrócitos para as camadas molecular do giro dentado e a camada lacunoso molecular de CA1-2 empregando o fracionador óptico nos diferentes grupos experimentais.

4. DISCUSSÃO

Empregamos modelo de infecção viral induzida pela inoculação intracerebral do vírus da dengue em camundongos neonatos com o objetivo de estudar o impacto da encefalite experimental sobre o número de astrócitos e microglias do hipocampo e giro denteado sete dias após a infecção.

Quantificou-se a resposta inflamatória nos strata lacunosum molecular (Lac Mol), radiatum (Rad) e pyramidale (Pir) de CA1-2 do hipocampo e na camada molecular do giro denteado (GDMol) usando o fracionador óptico.

Intensa astrocitose reativa e intensa ativação microglial foram encontradas em animais neonatos com sinais clínicos de meningoencefalite. Embora tenham sido maiores as estimativas do número de microglias ativadas nos infectados do que nos animais controles nas camadas GDMol e Rad, em relação ao número total de microglias (ativadas ou não) apenas o stratum radiatum mostrou diferença significativa.

Por outro lado apenas a camada molecular do giro denteado mostrou diferença no número de astrócitos. Tomados em conjunto os resultados sugerem que a resposta imune inata do camundongo neonato à encefalite induzida pelo vírus da dengue (sorotipo 3, genótipo III) está associada a um aumento maior do número de microglias do que de astrócitos reativos e essa mudança é dependente da camada e da região investigada.

4.1. ASTRÓCITOS REATIVOS E MICROGLIAS ATIVADAS NA ENCEFALITE VIRAL POR DENV3

Sob condições homeostáticas, as microglias e os astrócitos de diferentes regiões do sistema nervoso exibem um padrão morfológico de ramificações que os distingue dos macrófagos teciduais (RANSOHOFF e PERRY, 2009). Entretanto tem sido sistematicamente demonstrado que mesmo na ausência de doença neurológica, fenótipos microgliais mais reativos são expressos durante o desenvolvimento como parte do arsenal necessário para execução de funções fagocíticas associadas à morte celular programada e o refinamento dos circuitos cerebrais (WIERZBA-BOBROWICZ, 2002).

De fato, pelo menos três diferentes formas de morte celular programada foram detectadas, sendo atualmente reconhecido que após as infecções virais a apoptose é a forma mais freqüente. Nela, a célula alvo da programação sofre condensação de sua cromatina e fragmentação nuclear dando origem a corpos apoptóticos (BREDESEN, RAO e MEHLEN, 2006).

A cascata apoptótica assegura que as células individuais no interior de um ambiente celular numeroso e complexo sejam seletivamente eleitas para eliminação através de processos digestivos nas células da linhagem macrofágica (PERRY e O'CONNOR, 2008).

No presente trabalho numerosas células apoptóticas foram encontradas nos animais controle e infectados, apesar de que em diferentes proporções. De fato, como esperado, o número de células apoptóticas nos animais infectados pareceu muito maior do que nos animais controle, assim como o número de astrócitos e microglias em atividade fagocítica. Nos dois casos o formato arredondado do corpo celular com aumento de sua área e o encurtamento e espessamento dos ramos foi a alteração morfológica mais evidente preenchendo os requisitos para incluí-las no grupo de células ativadas.

A microglia ativada, em particular, tem sido usada como instrumento de medida para detectar regiões cerebrais que estão sofrendo processos degenerativos e disfunções associadas, sendo indicador sensível de alterações neuronais ou de morte celular ou ainda de modificações homeostáticas (KREUTZBERG, 1996, WIERZBA-BOBROWICZ et al., 2002, CUNNINGHAM, 2005).

No presente trabalho os principais fenótipos encontrados incluíram microglias ramificadas, em bastão e amebóide misturadas à formas microgliais que parecem não se enquadrar claramente em nenhum dos casos, sugerindo a ocorrência de um contínuo morfológico entre os tipos bem definidos.

4.2. O MODELO DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL PARA INDUÇÃO DA ENCEFALITE POR DENV

Em observações anteriores no hospedeiro adulto, Diniz e colaboradores (dados não publicados) demonstraram que a expansão de células T associadas a exercício físico em doença viral induzida por inoculação com o DENV3 genótipo III (o mesmo sorotipo

empregado no presente trabalho), era exacerbada pela inoculação de anticorpo heterólogo 24h após a inoculação intraperitoneal do vírus, agravando os sintomas e expandindo o número de óbitos em maior proporção nos animais exercitados do que nos sedentários.

Apesar desse agravamento, nenhuma alteração apreciável da morfologia microglial foi detectada no SNC, sugerindo que após a infecção periférica não parece ter havido interrupção da barreira hemato-encefálica. Como consequência, o estudo das encefalites virais experimentais induzidas por DENV tem utilizado a inoculação intracerebral como meio de ultrapassar a barreira e minimizar os efeitos da resposta imune periférica.

De fato, modelo experimental murino foi recentemente empregado para estudar a resposta imune do hospedeiro adulto a partir de inoculação intracerebral (AMARAL et al., 2011). Nesse estudo demonstrou-se que os camundongos infectados por via intracerebral pela variedade DENV-3 (genótipo I) (mas não pela variedade DENV-3 genótipo III empregada no presente trabalho) desenvolveram meningo-encefalite caracterizada pela infiltração de neutrófilos e células mononucleares sugerindo que a resposta inflamatória pode desempenhar papel chave no desenvolvimento das manifestações neurológicas associadas à dengue.

Em contraste com o encontrado no hospedeiro adulto (AMARAL et al., 2011), os camundongos neonatos empregados no presente trabalho e infectados com DENV3 genótipo III, desenvolveram encefalite fatal com óbito de todos os animais infectados ocorrendo no sétimo dia após a inoculação, sugerindo que a resposta imune inata imatura do camundongo neonato é incapaz de impedir a instalação ou conter a encefalite em curso. Precedendo a morte, resposta inflamatória caracterizada pela mudança morfológica compatível com a presença de ativação microglial e reatividade astrocítica aumentada foi detectada no 7º dia após a inoculação. Esses achados são compatíveis com a descrição de que a astrogliose se instala em geral entre o 7º e o 10º dia após a lesão (PANICKAR e NOREMBERG, 2005).

Coerente com esses achados morfológicos tem sido demonstrado que os astrócitos reativos e as microglias ativadas expressam receptores toll-like, usados como moléculas de reconhecimento, assim como secretam citocinas e quimiocinas típicas da resposta imune inata inflamatória. Além disso, apesar da função de célula apresentadora de antígenos do astrócito ainda está em discussão, astrócitos reativos expressam moléculas

do complexo de histocompatibilidade das classes I e II assim como moléculas co-estimulatórias (KAMINSKA et al., 2009).

Contrariamente ao que seria esperado, a resposta microglial e astrocítica nos camundongos infectados revelou uma diminuição nas estimativas do número total dessas células nas áreas investigadas quando comparamos os animais doentes aos controles, sugerindo que no cérebro em desenvolvimento ocorre uma resposta inflamatória atípica, em relação ao vírus da Dengue sorotipo 3, genótipo III.

Para interpretar esses achados é útil lembrar que apenas duas moléculas chave envolvidas na sobrevivência microglial até então foram descritas: a melhor estudada é o fator estimulante de colônia de macrófagos 1 (MCSF-1) (KONDO e DUNCAN, 2009).

Em camundongos transgênicos onde esta molécula foi removida, denominados camundongos osteopetróticos (op/op), foi possível detectar perda no número de microglias de cerca de 24% no córtex cerebral quando comparados aos controles selvagens, mas morfologia é relativamente normal (KONDO e DUNCAN, 2009).

Após lesão induzida, a microgliose no camundongo deficiente em MCSF-1 é significativamente menor do que no controle selvagem e a morfologia do mutante e do controle mudam para o perfil ativado (KONDO e DUNCAN, 2009).

Mais recentemente outro ligante para o receptor de MCSF foi descoberto e denominado IL-34. Este ligante é altamente expresso no cérebro ao nível de mRNA e em menor extensão em outros tecidos (ver (BURNS e WILKS, 2011) para revisão).

No presente trabalho, encontramos morfologia microglial ativada em maior proporção nos animais infectados pelo vírus quando comparados aos controles, porém com redução do número total de microglias nos animais infectados. Assim, poderia ser interpretado que tanto o MCSF e/ou o IL-34 estariam diminuídos ao longo da infecção e isso poderia estar associado à contenção do processo inflamatório, apesar de não explicar a mudança morfológica microglial encontrada no presente trabalho.

De qualquer modo como as microglias secretam fatores que estimulam a proliferação e diferenciação dos astrócitos (NAKANISHI et al., 2007, ANTONY et al., 2011) é razoável supor que diante de sua diminuição, haveria proporcionalmente redução no número de astrócitos. Permanece por ser explicado, entretanto como uma infecção durante o desenvolvimento induziria a redução dos fatores MCSF1 e IL-34.

Em relação aos astrócitos apesar de ter havido em anos recentes melhor compreensão dos mecanismos associados à astrogliose, de longe a resposta mais ubíqua à

lesão do SNC, um balanço de suas ações neuroprotetoras e neurotóxicas nas infecções virais permanece por ser determinado (ROCK et al., 2004).

4.3. ESTIMATIVAS ESTEREOLÓGICAS DE ASTRÓCITOS E MICROGLIAS NAS ENCEFALITES VIRAIS

A utilização da quantificação estereológica para astrocitose e microgliose pode ser instrumento importante para definir os limites a partir dos quais tais alterações ao invés de promover neuroproteção produzem neurotoxicidade (BLOCK, ZECCA e JS, 2007).

Apesar de que alguns estudos empregaram métodos estereológicos para quantificar aspectos neuropatológicos das encefalites (KETZLER et al., 1990, EVERALL et al., 1999, MARCARIO et al., 2004), nenhum deles se dedicou a estudar a resposta inflamatória do hospedeiro neonato na encefalite viral experimental induzida pelo vírus da dengue utilizando estereologia. Dessa forma, as relações quantitativas da astrocitose reativa e da ativação microglial esperadas não foram firmemente estabelecidas no sistema nervoso em desenvolvimento, sendo esse o principal objetivo alcançado no presente trabalho.

Realmente o presente trabalho se constitui na primeira tentativa dedicada a estimar o número de microglias e astrócitos no camundongo neonato após encefalite por DENV empregando metodologia sem viés. De qualquer modo ainda que se tenha empregado o fracionador óptico, eventuais limitações associadas aos procedimentos metodológicos podem contribuir para introdução de vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos que podem afetar os resultados. Dentre esses as ambiguidades na definição dos objetos e das áreas de interesse, além das diferenças no processamento de tecidos são os mais frequentes. Por exemplo, é comum optar por secções obtidas com auxílio de vibrátomo para estudos imunohistoquímicos e isso parece estar relacionado ao fato de que os anticorpos parecem penetrar mais facilmente e.g. (DORPH-PETERSEN, NYENGAARD e GUNDERSEN, 2001).

Estudos recentes, entretanto, não encontram perda de objetos de interesse nas superfícies das secções sugerindo o contrário, um acréscimo do número de objetos nessas regiões possivelmente decorrentes da compressão maior nas faces expostas à navalha durante o corte (ver figura 10) (GARDELLA et al., 2003). Assim é possível que esse efeito se traduza em estimativas diferentes quando as caixas de contagens estão dispostas

na superfície ou no centro das secções: enquanto a primeira abordagem tenderia a superestimar, a última tenderia a subestimar os valores.

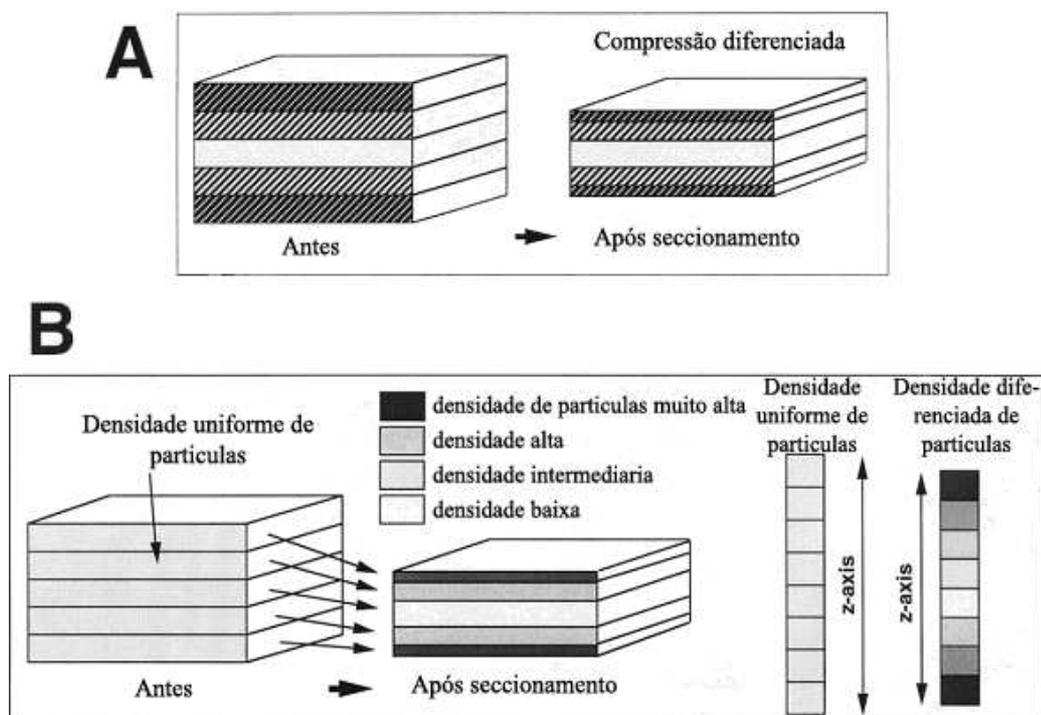


Figura 105. Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferencial não homogênea. Fonte: (GARDELLA et al., 2003)

Este tipo de problema afeta todas as estimativas que empregam o dissecor óptico, dado que a densidade de objetos de interesse e o volume de referência são diretamente atingidos pelo efeito de compressão. No presente trabalho, entretanto empregou-se o fracionador óptico, metodologia que não utiliza nem a densidade nem o volume de referência como parâmetros para estimativa do número de neurônios o que a torna imune aos efeitos da retração diferencial e compressão não lineares induzidas pelo processo de fixação, corte e desidratação. Além disso, adotamos zona de guarda para evitar o problema do dano tecidual na superfície de corte onde perda provável de objetos de interesse ocorreria se a contagem fosse realizada sem essa providência (ANDERSEN e GUNDERSEN, 1999).

Do ponto de vista da análise estatística, por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total ($CE^2/CV^2 < 0.5$,

onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e $CV=(\text{Desvio Padrão}/\text{Média})$.

No presente trabalho, a relação CE^2/CV^2 esteve quase sempre abaixo de 0.5 exceto para as estimativas do número de microglias ativadas, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens. Para o caso específico das estimativas do número de microglias ativadas contagens suplementares empregando caixa e grade de contagens do mesmo tamanho serão necessárias para reduzir o erro metodológico e intrínseco.

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

Em todos os casos (a exceção das contagens para microglia ativada que precisam ser refeitas com caixa e grade de contagem iguais) encontrou-se que a variação biológica contribuiu em maior proporção para a variância situando-se acima de 60%. Nos casos onde isso não aconteceu, a variância introduzida tanto pelo erro metodológico intrínseco quanto pela variação biológica eram tão pequenos que a regra geral $CE^2/CV^2 < 0.5$ não faz sentido e nem deve ser aplicada (SLOMIANKA e WEST, 2005).

Para reduzir essas possíveis fontes de erro, todos os dados foram obtidos levando em conta um mesmo protocolo de processamento (perfusão, reações imuno-histoquímica, desidratação, etc.) sendo coletados e analisados utilizando o mesmo método estereológico, software e hardware.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES:

A importância do esforço de quantificar essa resposta pode ser avaliada pelo fato de que processos inflamatórios durante o período perinatal têm sido considerados fator de risco elevado para doenças neuropsiquiátricas como o autismo ou a esquizofrenia (BROWN e PATTERSON, 2011) ou para desordens neurológicas incapacitantes (JOHNSTON e HAUSER, 2008).

Como na inflamação cerebral a microglia é a célula efetora primária seguida de perto pelos astrócitos, é possível que essas células respondam em grande parte pelas disfunções sinápticas associadas a essas doenças. No presente trabalho um processo infeccioso induzido intracerebralmente com impacto direto sobre as populações astrocíticas e microgliais, com muito maior probabilidade pode ocasionar alterações inflamatórias pós-infecciosas deixando seqüelas permanentes.

Eram objetivos específicos do presente trabalho: 1) Implementar o camundongo suíço albino neonato como modelo experimental para investigar a resposta imune inata nas encefalites virais produzidas pelo vírus da Dengue; 2) Investigar e quantificar a resposta glial no hospedeiro neonato através de estimativas estereológicas do número de astrócitos e de microglias no hipocampo e giro denteado.

O modelo de encefalite viral em camundongo neonato induzida pela variedade DENV3 genótipo III foi implementado com sucesso e contrariamente ao que se esperaria, uma encefalite viral durante o período de desenvolvimento pós-natal apesar de aumentar o número de microglias ativadas, parece diminuir o número total de microglias e astrócitos do hipocampo e do giro denteado.

Entretanto até o presente a conexão entre inflamação perinatal, ativação microglial, reatividade astrocítica e função cerebral no animal neonato ou adulto permanece mal compreendida. Trabalho futuro dedicado a desvendar o papel da microglia e do astrócito durante o desenvolvimento saudável ou patológico certamente contribuirá para elucidar as bases moleculares de tais alterações.

REFERÊNCIAS

- ALLAMAN, I., BÉLANGER, M., MAGISTRETTI, P.J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. **Trends Neurosci**, v.34, p.76-87, Feb.2011.
- AMARAL, D.C., et al. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. **J Neuroinflammation**, v.8, p.23, 2011.
- ANDERSEN, B.B., GUNDERSEN, H.J. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. **J Microsc**, v.196, p.69-73, Oct.1999.
- ANTONY, J.M., et al. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. **J Neurosci Res**, v.89, p.286-298, Mar.2011.
- BECHADE, C., et al. Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2. **Mol Cell Neurosci**, v.46, p.762-769, Apr.2011.
- BLOCK, M., ZECCA, L., JS, H. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Review Neuroscience**, v.8, p.57-69, 2007.
- BONTHIUS, D.J., et al. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. **Brain Res Brain Res Protoc**, v.14, p.45-57, Nov.2004.
- BORNER, R., et al. Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: Stereological analysis in the albino Swiss mice model. **Prion**, v.5, Jul 1.2011.
- BREDESEN, D.E., RAO, R.V., MEHLEN, P. Cell death in the nervous system. **Nature**, v.443, p.796-802, Oct 19.2006.
- BRITO, C.A., et al. Acute disseminated encephalomyelitis in classic dengue. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, p.236-238, Mar-Apr.2007.
- BROWN, A.S., PATTERSON, P.H. Maternal infection and schizophrenia: implications for prevention. **Schizophr Bull**, v.37, p.284-290, Mar.2011.
- BURNS, C.J., WILKS, A.F. c-FMS inhibitors: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v.21, p.147-165, Feb.2011.
- CAJAL, S.A.R., Y. **Histology of the Nervous System**, , 1995.
- CAJAL, S.R. Contribucion al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. **Trab Lab Investig Biol**, v.11, p.255-315, 1913.
- CHAKRABORTY, S., et al. Neurons under viral attack: victims or warriors? **Neurochem Int**, v.56, p.727-735, May-Jun.2010.
- CORDEIRO, M.T., et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, p.605-611, Nov-Dec.2007.
- CUNNINGHAM, C. **Mouse behavioral studies and what they can teach us about prion diseases.**, p.111-137, 2005.
- DAVALOS, D., et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v.8, p.752-758, Jun.2005.
- DINIZ, J., et al. Early and Late Pathogenic Events of Newborn Mice Encephalitis Experimentally Induced by Itacaiunas and Curionopolis Bracorhabdoviruses Infection. **PLOS-One**, v.3, p.e1733, 2008.
- DOMINGUES, R.B., et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J Neurol Sci**, v.267, p.36-40, Apr 15.2008.

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

DOS SANTOS, H.W., et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. **J Med Virol**, v.80, p.1426-1433, Aug.2008.

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

FANTIN, A., et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. **Blood**, v.116, p.829-840, Aug 5.2010.

GARDELLA, D., et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. **J Neurosci Methods**, v.124, p.45-59, Mar 30.2003.

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

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol**, v.10, p.100-103, Feb.2002.

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

GUZMAN, M.G., et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v.8, p.S7-16, Dec.2010.

HERBOMEL, P., THISSE, B., THISSE, C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. **Dev Biol**, v.238, p.274-288, Oct 15.2001.

INNOCENTI, G.M., CLARKE, S., KOPPEL, H. Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. **Brain Res**, v.313, p.55-66, Dec.1983.

JAIN, A., CHATURVEDI, U.C. Dengue in infants: an overview. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.59, p.119-130, Jul.2010.

JOHNSTON, S.C., HAUSER, S.L. Neurological disease on the global agenda. **Ann Neurol**, v.64, p.A11-12, Jul.2008.

KAMINSKA, B., et al. MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. **Anat Rec (Hoboken)**, v.292, p.1902-1913, Dec.2009.

KETTENMANN, H., VERKHRATSKY, A. Neuroglia: the 150 years after. **Trends Neurosci**, v.31, p.653-659, Dec.2008.

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

KONDO, Y., DUNCAN, I.D. Selective reduction in microglia density and function in the white matter of colony-stimulating factor-1-deficient mice. **J Neurosci Res**, v.87, p.2686-2695, Sep.2009.

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

- KRIEGSTEIN, A., ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu Rev Neurosci**, v.32, p.149-184, 2009.
- KUHN, R.J., et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v.108, p.717-725, Mar.2002.
- LIU, W., TANG, Y., FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. **Life Sci**, v.89, p.141-146, Aug 1.2011.
- MARCARIO, J.K., et al. Severe subcortical degeneration in macaques infected with neurovirulent simian immunodeficiency virus. **J Neurovirol**, v.10, p.387-399, Dec.2004.
- MELLOR, P.S., BOORMAN, J., BAYLIS, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. **Annu Rev Entomol**, v.45, p.307-340, 2000.
- NAKANISHI, M., et al. Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. **Eur J Neurosci**, v.25, p.649-658, Feb.2007.
- NAVARRO-SÁNCHEZ, E., DESPRÈS, P., CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res**, v.36, p.425-435, 2005 Sep-Oct.2005.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v.308, p.1314-1318, May 27.2005.
- PANCHAROEN, C., THISYAKORN, U. Neurological manifestations in dengue patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.32, p.341-345, Jun.2001.
- PANICKAR, K.S., NOREMBERG, M.D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. **Glia**, v.50, p.287-298, Jun.2005.
- PAOLICELLI, R.C., et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, v.333, p.1456-1458, Sep 9.2011.
- PERI, F., NUSSLEIN-VOLHARD, C. Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. **Cell**, v.133, p.916-927, May 30.2008.
- PERRY, V.H., O'CONNOR, V. C1q: the perfect complement for a synaptic feast? **Nat Rev Neurosci**, v.9, p.807-811, Nov.2008.
- PONT-LEZICA, L., et al. Physiological roles of microglia during development. **J Neurochem**, Sep.2011.
- RAIVICH, G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. **Trends Neurosci**, v.28, p.571-573, Nov.2005.
- RANSOHOFF, R.M., PERRY, V.H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.119-145, 2009.
- RIGATO, C., et al. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. **Glia**, v.59, p.675-695, Apr.2011.
- ROCK, R.B., et al. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v.17, p.942-964, table of contents, Oct.2004.
- ROTHMAN, A.L. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.338, p.83-98, 2010.
- RYMO, S.F., et al. A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. **PLoS One**, v.6, p.e15846, 2011.

SEET, R.C., LIM, E.C., WILDER-SMITH, E.P. Acute transverse myelitis following dengue virus infection. **J Clin Virol**, v.35, p.310-312, Mar.2006.

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

SOARES, C.N., et al. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **J Neurol Sci**, v.303, p.75-79, Apr 15.2011.

SOARES, C.N., et al. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **J Neurol Sci**, v.249, p.19-24, Nov 1.2006.

STEVENS, B., et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. **Cell**, v.131, p.1164-1178, Dec 14.2007.

TDR/WHO. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.**, 2009.

TRAVASSOS DA ROSA, A., VASCONCELOS, P., TRAVASSOS DA ROSA, J.E. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**.p.296, 1998.

VAN GROEN, T., MIETTINEN, P., KADISH, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v.13, p.133-149, 2003.

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

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

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

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

VERKHRATSKY, A., PARPURA, V. Recent advances in (patho)physiology of astroglia. **Acta Pharmacol Sin**, v.31, p.1044-1054, Sep.2010.

WAKSELMAN, S., et al. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. **J Neurosci**, v.28, p.8138-8143, Aug 6.2008.

WEAVER, S.C., REISEN, W.K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v.85, p.328-345, Feb.2010.

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

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

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

WIERZBA-BOBROWICZ, T., et al. Morphological analysis of active microglia - rod and ramified microglia in human brain affected by some neurological diseases (SSPE, Alzheimer's disease and Wilson's disease). v.40, p.125-131, 2002.

ANEXOS

ANEXO I – PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA GFAP

	Tempo
Ácido bórico 0,2M ph 9.0	1h
PBST 5%	2 min
PBST 5%	2 min
PBST 5%	2 min
Solução peróxido de hidrogênio 1%	10 min
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
Bloqueio de IgG (kit M.O.M.)	
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
Solução de concentrado de proteína (kit M.O.M.)	5 min
Anticorpo anti-GFAP (1:800)	48 h
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
Anticorpo secundário biotinilado cavalo-anti-camundongo	24h
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
PBS 0,1M	2 min
Complexo avidina/biotina/peroxidase (kit M.O.M.)	1h
PB 0,1M	2 min
PB 0,1M	2 min
PB 0,1M	2 min
Solução GND	Até 30 min
PB 0,1M	2 min
PB 0,1M	2 min
PB 0,1M	2 min

ANEXO II – PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IBA-1

	Tempo
Ácido bórico 0,2M ph 9.0	1h
TBST 5%	2 min
TBST 5%	2 min
TBST 5%	2 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
Bloqueio de IgG (caseína a 0.5%)	1h
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
Anticorpo anti-IBA-1 (1:400)	48 h
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
Anticorpo secundário cavalo-anti-coelho/camundongo	24h
Solução de peróxido 0.3%	10 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
Complexo avidina/biotina/peroxidase (kit M.O.M.)	1h
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
TBS 0,1M	2 min
Solução GND	Até 30 min
TB 0,1M	2 min
TB 0,1M	2 min
TB 0,1M	2 min

ANEXO III – PROTOCOLO DE CONTRACOLORAÇÃO DE NISSL PARA LÂMINAS PREVIAMENTE DESIDRATADAS.

	TEMPO
Álcool 100%	5 min
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	10 min
Álcool 95%	3 min
Álcool 75%	3 min
Água destilada	Somente lavagem
Cresil violeta	4 min
Água destilada	Somente lavagem
Álcool 80%	3 min
Álcool 90%	10 min
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	3 min
Álcool 95% + ácido acético	3 min
Álcool 95% durante 6 minutos;	6 min
Álcool 100% + ácido butílico (1:1)	3 min
Xileno I	5 min
Xileno II	5 min

ANEXO IV - DOCUMENTO DO COMITÊ DE ÉTICA

**PARECER BIO034-11**

Projeto: Estudos Experimentais das Alterações do Sistema Nervoso induzidas pela Dengue: aspectos comportamentais e neuropatológicos

Coordenador: Prof. Dr. Cristovam W. P. Dimiz

Área Temática: Neurociências

Vigência: 11/2008 a 12/2013

Nº no CEPAE-UFPA: BIO034-11

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de outubro de 2008

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