



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

ALEXANDRE MAIA DE FARIAS

**ESTUDO DA NEUROLOGIA INDUZIDA PELO VÍRUS MARABÁ
EM MODELO MURINO**

BELÉM-PA
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

ALEXANDRE MAIA DE FARIAS

ESTUDO DA NEUROLOGIA INDUZIDA PELO VÍRUS MARABÁ EM MODELO MURINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito à obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Dr. José Antônio Picanço Diniz Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço
Diniz

BELÉM-PA
2014

Alexandre Maia de Farias

ESTUDO DA NEUROPTATOLOGIA INDUZIDA PELO VÍRUS MARABÁ EM MODELO MURINO

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

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Junior (orientador)
Departamento de Microcopia Eletrônica,
Instituto Evandro Chagas, PA.

Dr^a Ana Paula Drummond Rodrigues (membro)
Seção de Arbovirologia e Microscopia Eletrônica
Instituto Evandro Chagas, PA.

Dr. Enio Maurício Nery dos Santos (membro)
Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional
ICB, UFPA.

Dr^a. Patrícia Karla Santos Ramos (suplente)
Seção de Parasitologia
Instituto Evandro Chagas.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Dr. José Antônio Picanço Diniz Junior, do Departamento de Microscopia Eletrônica, Secção de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém –PA, e a co-orientação do Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção da Universidade Federal do Pará (UFPA), no período de março de 2011 a Fevereiro de 2014. Nesse período, tivemos o apoio financeiro da Universidade do Estado do Pará (UEPA), da UFPA e do IEC.

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Microscopia Eletrônica; Secção de Arbovírus, IEC/PA.
- Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, ICB, UFPA.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha amada esposa, pelo companheirismo, apoio e entendimento; e ao meu Pai Judas Tadeu de Farias, pelo exemplo de vida que deixou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à força superior que nos move e nos faz persistir em nossa jornada em busca da verdade e de nós mesmos.

Agradeço muito à minha família amada pela alegria que me recebe todos os dias e que me faz esquecer o cansaço de um dia difícil.

Meus agradecimentos sinceros à Prof^o Roseane Borner, Prof^o Cristovam Diniz, Prof^a Samia, Rodrigo Sena, Natalie Chaves, Calima Mendes, Antonio Neto, Ana Karissa, Giovanni Freitas, Daniel Diniz, Priscila, Ana Paula Rodrigues, Marcio Sfair, que foram fundamentais para a conclusão deste projeto.

À minha mãe pelas horas de dedicação e educação dedicados a mim, e à Jaime e Virgínia Reis pelo constante apoio dedicado à minha família nas minhas horas de ausência.

Ao IEC, à UFPA e a UEPA que propiciaram condições para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador pelos ensinamentos, compreensão, paciência, atenção, dedicação, e principalmente pelo incentivo a continuar persistindo até alcançar o meu objetivo.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos”.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

O vírus Marabá (Be AR 411459) é um Vesiculovírus (VSV), membro da família *Rhabdoviridae*, isolado em 1983, de um *pool* de flebotomíneos capturado em Marabá-PA pela Seção de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas. Na literatura pouco se tem sobre neuropatologia experimental induzida pelo vírus Marabá, apesar dos 30 anos de isolamento. Um único estudo, porém, revelou que a infecção viral em camundongos recém-nascidos provoca necrose e picnose em neurônios em várias regiões do sistema nervoso central (SNC). O objetivo do presente trabalho foi investigar a distribuição do vírus Marabá no SNC, a ativação microglial e astrocitária, aspectos histopatológicos; e a expressão de citocinas e óxido nítrico (NO), na encefalite induzida pelo vírus Marabá em camundongo BALB/c adultos. Para tanto, foram realizados processamentos de amostras para análise histopatológica; imunohistoquímica para marcação de microglia, astrócitos e antígeno viral; testes de quantificação de citocinas e NO; e análises estatísticas. Os resultados demonstraram que os animais infectados (Ai) 3 dias após a inoculação (d.p.i.) apresentam discreta marcação do antígeno viral, bem como quanto a ativação de microglia e astrócitos no SNC. Por outro lado, nos Ai 6 d.p.i. a marcação do antígeno viral foi observada em quase todas regiões encefálicas, observando-se intensa ativação microglial nestes locais, embora a astrogliose tenha sido menor. Edema, necrose e apoptose de neurônios foram observados principalmente no bulbo olfatório, septo interventricular e córtex frontal dos Ai 6 d.p.i. A quantificação dos níveis de IL-12p40, IL-10, IL-6, TNF- α , INF- γ , MCP-1 e de NO mostrou aumentos significativos nos Ai 6 d.p.i., quando comparados aos animais controles e Ai 3 d.p.i.. Por outro lado, os níveis de TGF- β , importante imunossupressor, não foi significativo em todos os grupos e tempos avaliados (3 e 6 d.p.i.). Estes resultados indicam que o vírus Marabá pode infectar diversas regiões do SNC de camundongo BALB/c adulto 6 d.p.i., produzindo alterações anátomo-patológicas e uma forte resposta imune inflamatória que pode ser letal para o animal.

Palavras-chave: Resposta imune. Microglia. Astrócitos. Neurônios. Vírus Marabá. Citocinas. Óxido nítrico.

ABSTRACT

The Marabá virus (Be AR 411459) is an Vesiculovirus (VSV) , member of the Rhabdoviridae family, isolated in 1983 from a pool of sandflies captured in Marabá - PA by Section Arbovirus the Evandro Chagas Institute. In literature There are few studies on experimental neuropathology Marabá virus induced, despite 30 years of isolation. A single study , however, revealed that viral infection in newborn mice causes necrosis and pyknosis in neurons in several regions of the central nervous system (CNS). The objective of this study was to investigate the distribution of Marabá virus in the CNS , reactive microglia and astrocytes , histopathologic features , and the expression of cytokines and nitric oxide (NO) , in Marabá virus-induced encephalitis in BALB / c mice. Thus was performed processing of samples for histopathological examination; Immunohistochemistry for observation of microglia, astrocytes and viral antigen ; tests for quantification of cytokines and NO , and statistical analyzes. The results showed that infected animals (Ai) 3 days after inoculation (d.p.i.) with discrete labeling of viral antigen, as well as the activation of microglia and astrocytes in the CNS. Moreover , in Ai 6 d.p.i. marking the viral antigen was observed in almost all brain regions, with intense microglial activation in these locations, although was less astrogliosis. Edema, necrosis and apoptosis of neurons were mainly observed in the olfactory bulb, septum and frontal cortex of Ai 6 d.p.i. Quantification of IL - 12p40 , IL- 10, IL- 6, TNF- α , INF- γ , MCP-1 and NO, showed significant increases in Ai 6 d.p.i., when compared with controls animals and Ai 3 d.p.i. On the other hand, TGF- β , important immunosuppressant, has not been significant in all groups and evaluated times (3 and 6 d.p.i.) . These results indicate that Marabá virus can infect various CNS regions of BALB /c mouse adult 6 d.p.i. , producing anatomical and pathological changes and strong inflammatory immune response that can be lethal to the animal.

Keywords : immune response . Micróglia . Astrocytes. Neurons . Marabá virus. Cytokines. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – (A) Eletronmicrografia de partículas por contrastação negativa de um isolado de *Vesicular stomatitis Indiana virus*. (B) Diagrama ilustrando um virion of rabdovírus e a estrutura do nucleocapsídeo19
- Figura 2 – Mapa do Estado do Pará, mostrando a área de captura das 70 fêmeas de flebotomínios (*Lutzomia spp*) com os vírus Marabá, em Serra Norte que em 1984 fazia parte do município de Marabá. (Fonte:<http://www.transportes.gov.br/bit/mapas/mapdoc/uf/mapas-dnit/pa-dnit.pdf>).....20
- Figura 3 – Desenho esquemático mostrando as células gliais.(Fonte:<http://sistema24.wordpress.com/category/un-categorized/>).....26
- Figura 4 – Fotomicrografias de secções de cérebro de camundongo controle (A - B) e de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 3 dias pós inoculação. (C – D), processados por imunohistoquímica para marcação do antígeno viral.....48
- Figura 5 – Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 6 d.p.i. (C, D, E, F) processados por imunohistoquímica para marcação do antígeno viral.49
- Figura 6 – Desenho esquemático de um encéfalo em corte sagital com delimitação de algumas regiões e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado 6 d.p.i., mostrando algumas das regiões encefálicas com marcação do antígeno viral.50
- Figura 7 – Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 3d.p.i. (C – D), processados por imunohistoquímica para marcação de Iba-1.....51

- Figura 8 – Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 6 d.p.i. (C, D, E, F,G) processados por imunohistoquímica para Iba-1.52
- Figura 9 – Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 3d.p.i. (C – D), processados por imunohistoquímica para marcação GFAP.53
- Figura10 – Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 6 d.p.i. (C, D, E, F) processados por imunohistoquímica para GFAP.....54
- Figura11 – Análise estatística da expressão da citocina IL-12p40 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e de cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação.....55
- Figura12 – Análise estatística da expressão da citocina IL-10 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e de cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação.....56
- Figura13 – Análise estatística da expressão da citocina TNF- α em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e de cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação.....57
- Figura14 – Análise estatística da expressão da citocina IL-6 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e de cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação.....58

- Figura15 – Análise estatística da expressão da citocina INF- γ em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e de cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação.....59
- Figura16 – Análise estatística da expressão da citocina MCP-1 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e de cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação60
- Figura17 – Análise estatística da expressão de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac: Animais controle

Ai: animais infectados

APCs: Células apresentadoras de antígenos

CBA: *Citometric Bead Array Set System*

CEUA: Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais

cNOS: Óxido nítrico sintase constitutiva

d.p.i.: dias pós inoculação

DL₅₀/0,02mL: Dose letal para 50% dos camundongos infectados por 0,02 mililitros

ECP: Efeito citopático

ELISA: *Linked Immunosorbent Assay*

EPCs: Equipamentos de proteção coletiva

EPIs: Equipamentos de proteção individual

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein* (Proteína glial fibrilar ácida)

GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCl: Ácido clorídrico

Iba-1: (*ionized calcium binding adaptor protein-1* (Proteína 1 adaptadora de ligação de cálcio ionizado))

i.c: Inoculação intracerebral

i.p.: Intraperitoneal

IEC: Instituto Evandro Chagas

IFNs: Interferons

IFN- γ : Interferon- γ

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-1 α : Interleucina-1 α

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4
IL-6: Interleucina-6
IL-10: Interleucina-6
IL-12: Interleucina-12
IL-12p70: Interleucina-12p70
IL-12p35: Interleucina-12p35
IL-12p40: Interleucina-12p40
iNOS: Óxido nítrico sintase induzida
LPS: Lipopolissacarídeos
LTC: Linfócito T citotóxico
MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos
MCSF: Fator estimulador de colônia de macrófagos
MHC I: Complexo principal de histocompatibilidade I
MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade I
M.O.M.: Mouse on Mouse
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
NOX: NADPH oxidase
Nox1: NADPH oxidase 1
O⁻²: ânion superóxido
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
ROS: *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)
RRP: Receptores de reconhecimento de padrão
SNC: Sistema Nervoso Central
TGF- β : Fator de crescimento tumoral- β
TLR 2: Receptores semelhantes ao Toll 2
TLR: *Toll like receptors* (Receptores semelhantes ao Toll)
TNF- α : Fator de necrose tumoral- α
VSV: Vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.2	ARBOVÍRUS E FAMÍLIA <i>RHABDOVIRIDAE</i>	17
1.3	VÍRUS MARABÁ.....	19
1.4	INFECÇÃO VIRAL NO SNC E RESPOSTA NEUROIMUNE.....	21
1.5	CÉLULAS DA GLIA.....	24
1.5.1	Astrócitos.....	26
1.5.2	Microglias	29
1.6	CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO.....	31
2.	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	PROCEDIMENTO DE BIOSSEGURANÇA	37
4.2	CEPAS VIRAIS.....	37
4.3	ANIMAIS.....	37
4.4	PRODUÇÃO DO INÓCULO E DO DE ESTOQUE VIRAL.....	38
4.5	TITULAÇÃO DO VÍRUS.....	39
4.6	SORO HOMÓLOGO.....	39
4.7	PERFUSÃO E CRANIOTOMIA.....	40
4.8	PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO.....	40
4.9	PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICOS.....	41
4.9.1	Imunohistoquímica para os antígenos virais e para GFAP.....	41
4.9.3	Imunohistoquímica para Microglia ativada.....	43
4.10	TESTES PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS E NO.....	44
4.10.1	Preparo do homogeneizado de cérebros de camundongo.....	44
4.10.2	Ensaio Imunoenzimático (ELISA do tipo sandwich).....	44
4.10.3	Citometria de Fluxo.....	45
4.10.4	Reagente de Griess para Quantificação de Nitrito.....	45

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 ANIMAIS INFECTADOS COM O VÍRUS MARABÁ.....	47
5.2 RESULTADOS DOS TESTES HISTOPATOLÓGICOS.....	47
5.3 DETECÇÃO DE ANTIGENOS VIRAIS	47
5.4 DETECÇÃO DE MICRÓGLIA	50
5.4 DETECÇÃO DE ASTRÓCITOS	53
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE DE CITOCINAS E NO.....	55
5.5.1 Técnica de ELISA tipo sandwich.....	55
5.5.2 Citometria de Fluxo.....	56
5.5.3 Reagente de Griess para Quantificação de Nitrito.....	60
6 DISCUSSÃO.....	62
6.1 PATOGÊNESE.....	62
6.2 RESPOSTA IMUNE NO SNC.....	65
7 CONCLUSÃO.....	75
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9. ANEXO.....	99

1 INTRODUÇÃO

Na região amazônica coexistem várias espécies de vertebrados silvestres e de artrópodes hematófagos que servem como hospedeiros e vetores, respectivamente, para muitos agentes patogênicos. Entre os diversos patógenos presentes nesta região, os arbovírus representam um grupo particularmente numeroso e desconhecido em sua variedade e patogenia. No bioma amazônico, os arbovírus encontram condições climáticas favoráveis e uma grande quantidade de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres, elementos fundamentais para a manutenção do ciclo de transmissão desses vírus na natureza (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

A capacidade patogênica de muitos arbovírus isolados de infectar e gerar danos em humanos ainda é desconhecida. Atualmente, sabe-se que 32 deles são descritos como causadores de arboviroses em homens, quatro deles (dengue, febre amarela, oropouche e mayaro) são de grande importância para a saúde pública, pois, além de causar doenças graves, podem promover surtos epidêmicos de considerável impacto econômico e social (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

Síndromes febris, febre com exantema, doenças hemorrágicas e encefalites, são sintomas causados pela infecção por alguns arbovírus, porém, na maioria das vezes, as arboviroses tem evolução benigna sem causar morte ou incapacidade (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Sabe-se que alguns arbovírus apresentam tropismo pelo sistema nervoso central (SNC) podendo infectar dentre outras células astrócitos, microglias e neurônios e resultar em prejuízos no equilíbrio metabólico, iônico e funcional do SNC.

A emergência ou reemergência de arboviroses dentro da Amazônia estão intimamente relacionadas ao manejo inadequado do ecossistema pelo homem, cujas sucessivas interferências levam os indivíduos a entrar em contato com os agentes causadores destas doenças. Esta realidade amazônica obriga a permanentes investimentos em saúde pública para a promoção de medidas preventivas, sócio-educativas, tratamentos da população e também na pesquisa de vacinas e da capacidade patogênica dos agentes causadores das arboviroses.

1.2 ARBOVÍRUS E FAMÍLIA *RHABDOVIRIDAE*

Em 1942 a expressão *arthropod-borne vírus* foi introduzida para descrição do grupo de vírus de animais que se propagavam em artrópodes e eram transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Duas décadas depois, o Subcomitê Internacional para Nomenclatura Viral recomendou a adoção oficial do termo arbovírus para designação dos vírus que são mantidos em natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados (KARABATSOS, 1985).

As arboviroses são, quase na sua totalidade, zoonoses mantidas em ambientes silvestres. Geralmente o ciclo dos arbovírus não envolve o homem. Entretanto, com as sucessivas interferências do homem na natureza, esses vírus acabam sendo transmitidos à espécie humana. A transmissão dos arbovírus entre a população humana ocorre de duas formas distintas: transmissão silvestre e urbana. Na transmissão silvestre, o homem é infectado quando penetra no nicho ecológico desses vírus, mediante picada de artrópode, resultando em pequeno número de casos, geralmente encontrados no mesmo local ou nas redondezas. Na transmissão urbana, a pessoa infectada passa a ser um hospedeiro disseminador, geralmente iniciando uma epidemia (homem – mosquito – homem), na área urbana (VASCONCELOS *et al.*, 1991), como ocorre nos casos de infecção pelos vírus da Febre Amarela, Oropouche, Dengue e Mayaro, na Amazônia (PINHEIRO *et al.*, 1986; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

A maioria dos arbovírus atualmente registrados, de acordo com suas propriedades físico-químicas, encontra-se distribuídos dentro de seis famílias: *Asfaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* e *Rhabdoviridae* (PINHEIRO *et al.*, 1997). Sabendo-se, porém, que nem todos os membros destas famílias são arbovírus (KARABATSOS, 1985).

A classificação do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) estabelece que família *Rhabdoviridae* está inserida na ordem *Mononegavirales*, que compreende nove gêneros – *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Novirhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Tibrovirus* – e espécies ainda não-relacionadas

(<http://www.ictvonline.org/virusTaxono-my.asp>). Outros sorogrupos tais como Hart Park, Kwatta, Timbó e Mossuri são incluídos como pertencentes à família *Rhabdoviridae*, mas não estão classificados nesses gêneros. Há também outros vírus nessa família que não foram sorogrupados (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

Os membros dos gêneros *Vesiculovirus* e *Lyssavirus* apresentam grande importância em saúde pública por causarem doenças no homem, como a estomatite vesicular e a raiva, respectivamente (WAGNER & ROSE, 1996). O gênero *Vesiculovirus* inclui o sorogrupo do vírus da Estomatite Vesicular (VSV), e o gênero *Lyssavirus* inclui os grupos antigênicos *Rabies*, *Bovine ephemeral fever* e *Tibrogargan*, que estão relacionados com a raiva e viroses relacionadas à raiva. (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

Os membros da família *Rhabdoviridae* são os mais amplamente distribuídos na natureza. Eles podem ser encontrados infectando invertebrados, vertebrados, assim como muitas espécies de plantas (WAGNER e ROSE, 1996). Os rabdovírus que infectam vertebrados e invertebrados apresentam a morfologia semelhante a uma “bala de revólver” (Figura 1), diferentemente dos vírus que infectam plantas que são baciliformes. O genoma é constituído por até 10 genes, entre os quais, apenas cinco são comuns a todos os membros da família. Estes genes codificam a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a proteína de matriz (M), a glicoproteína (G) e a polimerase viral (L). O genoma é associado com as proteínas N, L e P para formar o nucleocapsídeo, que é condensado pela proteína de matriz numa estrutura helicoidal enrolada firmemente (Figura 1). O nucleocapsídeo é rodeado por uma bicamada lipídica que contém a glicoproteína G, que constitui os receptores que se projetam a partir da superfície do vírus (AURÉLIE *et al.*, 2012).

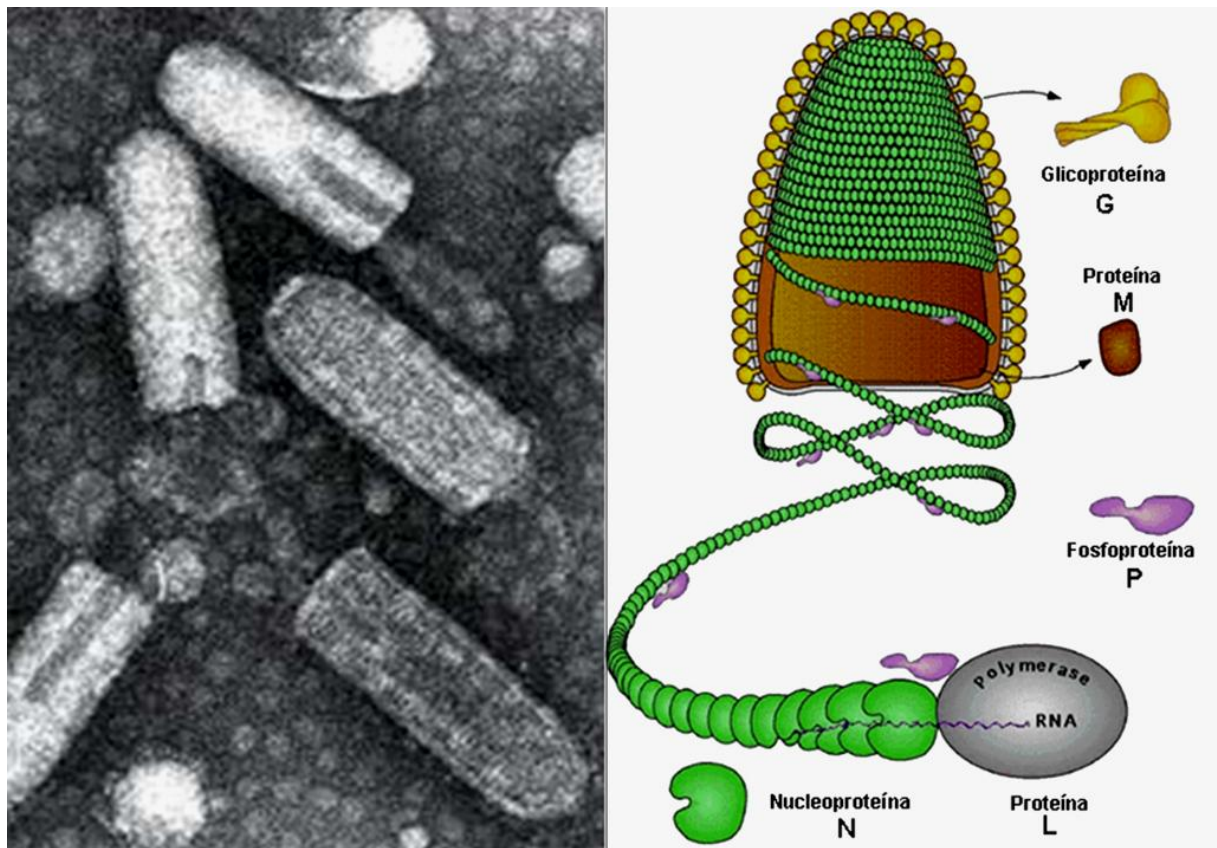


Figura 1 - (A) Eletronmicrografia de partículas por contrastação negativa de um isolado de *Vesicular stomatitis Indiana virus*. (B) Diagrama ilustrando um rabdovírus e a estrutura do nucleocapsídeo. G: glicoproteína G; M: proteína de matriz; P: fosfoproteína; L: polimerase viral; N: nucleoproteína (TORDO *et al.*, 2004).

1.3 VÍRUS MARABÁ (BE AR 411459)

O vírus Marabá é um arbovírus da família *Rhabdoviridae*, classificado como um membro do gênero VSV. Foi isolado em 4 de fevereiro de 1983, através de um grupo de 70 fêmeas Flebotomíneos (*Lutzomya* spp), capturados na estrada principal de Serra Norte, município de Marabá, Estado do Pará, Brasil (Figura 2).

Pouco se sabe sobre o potencial neuropatogênico deste vírus em humanos e em animais domésticos. Resultados de teste de neutralização sugerem que humanos não são frequentemente infectados (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1984), e que em camundongos e células Vero, a patogenicidade desse vírus é similar à encontrada no VSV-Indiana e VSV-New Jersey (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1984).

Na literatura existem poucos estudos descrevendo a neuropatologia experimental induzida por arbovírus (HUNEYCUTT *et al.*, 1994; DOBLER, 1996; HUNSPERGER & ROEHRUG, 2006). Assim também acontece com o Vírus Marabá, que apesar dos 30 anos de isolamento um único trabalho foi realizado com o objetivo de descrever a neuropatologia deste vírus. Este estudo revelou que a infecção camundongos recém-nascidos por via intranasal com o vírus Marabá provoca necrose e picnose de neurônios em várias regiões do sistema nervoso central incluindo cerebelo, hipocampo e Striatum (GOMES-LEAL *et al.*, 2006).



Figura 2 - Mapa do Estado do Pará, mostrando a área de captura das 70 fêmeas de flebotomíneos (*Lutzomia* sp) com os vírus Marabá, em Serra Norte que em 1984 fazia parte do município de Marabá, hoje município de Parauapebas.

<http://www.transportes.gov.br/bit/mapas/mapdoc/ufs/mapas-dnit/pa-dnit.pdf>

1.4 INFECÇÃO VIRAL E RESPOSTA IMUNE NO SNC

O SNC é alvo de uma variedade de microorganismos patogênicos como bactérias, protozoários, fungos e vírus. Varias espécies tem sido incriminadas como causadoras de encefalites virais, como por exemplo, o vírus da raiva, membro da família *Rhabdoviridae* (WILLOUGHBY *et al.*, 2005); os vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (SOUSA *et al.*, 2002) e o vírus T-linfotrópico humano 2, da família *Retroviridae* (SHINDO *et al.*, 2002); membros da família *Herpesviridae*, como o vírus da Varicella-zoster (GILDEN *et al.*, 2000), vírus Herpes simples (BLOOM *et al.*, 2010), *Citomegalovirus* (SILVA, 2010); e da família *Picornaviridae*, como *Poliovirus* (BELOV *et al.* 2010), *Coxsackievirus* (WENG *et al.*, 2010), *Echovirus* (MAO *et al.*, 2010).

A infecção no sistema nervoso central geralmente cria grandes dificuldades de tratamento devido ao rápido aparecimento de sintomas e agravamento da doença, mesmo em indivíduos saudáveis. Essa infecção pode levar a disfunções no sistema nervoso central ocasionando perda permanente ou transitória de memória, dificuldade de aprendizado, déficits motores, sensoriais e corroborar com a progressão de processos neurodegenetivos que, por fim, podem culminar em demência ou morte (ZIELASEK & HARTUNG, 1996; GARDEN & MOLLER, 2006; HENEKA *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ & VERKHRATSKY, 2011).

A invasão do vírus no SNC envolve várias etapas diferentes, tais como a entrada do agente patogênico no SNC, replicação no sítio primário da infecção, disseminação no tecido neural e resposta imunológica do hospedeiro, que pode resultar na resolução da infecção ou em danos ao SNC (CROTTY *et al.*, 2002; FAZAKERLEY, 2004; REMPEL *et al.*, 2004).

O grau de agressão da infecção viral em camundongos adultos depende significativamente da via de inoculação, do título do inóculo e da cepa viral (PINHEIRO, 1986). O pico do título viral da infecção por um VSV é entre o sétimo e décimo dia após a inoculação (d.p.i), isto está associado com morte de aproximadamente metade dos camundongos inoculados. Após 12 d.p.i. os camundongos sobreviventes estão praticamente livres de infecção viral (HUNEYCUTT *et al.*, 1993).

A instilação intranasal do VSV em camundongos de laboratório promove a entrada direta do vírus no SNC (FORGER *et al.*, 1991; HUNEYCUTT *et al.*, 1993; HUNEYCUTT *et al.*, 1994; PLAKHOV *et al.*, 1995). Inicialmente ocorre a infecção dos neurônios bipolares do epitélio olfatório, e posteriormente transmissão do vírus para os neurônios mitrais do bulbo olfatório (PLAKHOV *et al.*, 1995); criando, por fim, uma infecção aguda no SNC, com propagação para as áreas temporal, parietal, frontal, além de regiões límbicas (FORGER *et al.*, 1991; HUNEYCUTT *et al.*, 1994; LUNDH *et al.*, 1987). A infecção pode atingir diferentes áreas cerebrais por rotas neuronais que incluem, além da via olfatória, a via trigeminal e o sistema nervoso autônomo (BABIC *et al.*, 1994).

A propagação viral no SNC envolve diferentes tipos de transporte do vírus pelo parênquima cerebral, dentre elas destacamos: o transporte axoplasmático, retrógrado ou anterógrado, usando a via axonal e a comunicação sináptica para repassar o vírus a outras células (REISS *et al.*, 1994; LUNDH *et al.*, 1988; LUNDH *et al.*, 1990); e por via hematogênica, cuja disseminação viral ocorre quando células infectadas transpõem a barreira hematoencefálica e alcançam a circulação sanguínea e/ou cefalorraquidiana, indo deste modo infectar locais distantes do sítio de infecção primária (LANE *et al.*, 1996; CARD *et al.*, 1998; CARD *et al.*, 1999; HUNEYCUTT *et al.*, 1993; HUNEYCUTT *et al.*, 1994; PLAKHOV *et al.*, 1995). A infecção viral por VSV, sorotipo New Jersey, por exemplo, acomete várias regiões do cérebro, demonstrando claramente característica hematogênicas e axoplasmáticas da propagação viral pelo parênquima cerebral (CORNISH *et al.*, 2001).

Cornish e colaboradores (2001), observaram lesões histológicas provocadas pela infecção de um VSV com necrose em neurônios de muitas regiões do cérebro, incluindo toda a camada de células periventricular ao redor dos ventrículos laterais, terceiro e quarto ventrículos. Necroses irregulares também foram consistentemente observadas no núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório, regiões talâmicas, córtex piriforme, camada molecular e piramidal do Hipocampus, giro denteado, núcleos hipotalâmicos, septo interventricular, complexo amigdalóide, e vários núcleos do tronco encefálico, incluindo núcleos da Raphe, núcleo do trato solitário, núcleo hipoglossal e lócus cereleus.

Além de necrose, alternativamente infecções por VSV também podem induzir apoptose. As células neurais infectadas pelo VSV exibem uma coloração escura denotando um padrão de degeneração (DALAKAS, 1995). Em animais neonatos os Vesiculovirus provocam necrose e apoptose, sendo que a primeira é mais evidente no córtex cerebral e a segunda, no hipocampo, levando a morte em cerca de 18h após a inoculação (GOMES-LEAL *et al.*, 2006). Estes resultados possuem forte correlação com a resposta inflamatória induzida pela virose (ROULSTON *et al.*, 1999; JULKUNEM *et al.*, 2000; REMPEL *et al.*, 2004).

A infecção quando se dá pelo Vírus da encefalomielite murina de Theiler, um picornavírus de camundongos do gênero *Cardiovirus*, assim como outros membros da família *Picornaviridae*, a disseminação se dá de forma diferente, ocorrendo primeiramente infecção dos neurônios do hipocampo, córtex, estriado e medula espinhal para posteriormente se espalhar para outras células por meio do transporte axonal em aproximadamente duas semanas (BRAHIC *et al.*, 2005; BRAHIC & ROUSSARIE, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2003; ROUSSARIE *et al.*, 2007a, 2007b).

A ação neuroimune à invasão viral conta com uma sequencia de eventos que podem corroborar com a limpeza do ambiente cerebral. A fase inicial de uma resposta imune efetiva contra um patógeno invasor é realizada por uma resposta do sistema imune inato (FARINA *et al.*, 2007). Esse tipo de resposta é independente de células T e B de memória e pode ser direcionada através de sistemas de reconhecimento específicos (FARINA *et al.*, 2007). Alguns estudos ratificaram esta hipótese demonstrando que a primeira resposta inflamatória à neuroinvasão por VSV é efetuada por astrócitos e microglias (HUNEYCUTT *et al.*, 1993; NANSEN *et al.*, 2000). A ativação destas células gliais envolvem reações complexas conhecidas por gliose reativa (HENEKA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2006; STREIT *et al.*, 2004), que é resumidamente um processo no qual ocorrem mudanças na morfologia das células gliais, juntamente com aumento da motilidade, da atividade fagocitária e liberação de moléculas pró-inflamatórias que induzem outros mecanismos de defesa da resposta imune, tanto inato quanto adaptativo. No entanto, embora a gliose reativa seja reconhecida como um processo de neuroproteção, existem fortes evidências desta

reação na gênese ou no aumento de processos neurodegenerativos (SOLA *et al.*, 2002; BÓRAN *et al.*, 2008; SAMANTA, 2012).

Estudos com animais jovens em modelos experimentais de viroses neurotrópicas citopáticas, tal como as vesiculoviroses, tem verificado que além de estimular a gliose reativa, ocorre também migração de células do sangue periférico ao SNC, como as células dendríticas e os linfócitos T, cujo objetivo é de reforçar a defesa imunológica e combater tal infecção (STEEL, 2009; LIU, 2009; MCCANDLESS, 2008; CIAVARRA, 2006).

A astrogliose e a ativação microglial estão entre as reações imunes obtidas em modelos experimentais de dano neuronal como isquemia, axotomia (GRAEBER *et al.*, 1988; BARRON *et al.*, 1990), estimulação elétrica (LEE-HALL *et al.*, 1989) e lesão neurotóxica (AKIYAMA *et al.*, 1994; ACARIN *et al.*, 1996), infecções microbianas e doenças neurodegenerativas (HAGA *et al.*, 1989; GRAEBER & STREIT, 1990). Portanto, dada importância das células gliais na resposta neuroimune à infecção viral no SNC, serão descritas agora algumas das características importantes de microglias e astrócitos.

1.5 CÉLULAS GLIAIS

As células gliais ou neurogliais realizam funções importantes no SNC que começam desde os primeiros momentos do desenvolvimento do tecido neural e se estendem por toda a vida. Estão envolvidas em atividades fundamentais para o desenvolvimento, defesa, nutrição e homeostase do parênquima cerebral. (BRODAL, 2010; SNELL, 2003).

Rudolf Virchow em 1846 utilizou pela primeira vez o termo “neuroglia” para descrever regiões entre os neurônios, que ele considerava semelhante ao tecido conjuntivo cimentante observado em outros órgãos. A descoberta de que a região era formada por células não neuronais só foi possível com o desenvolvimento de técnicas baseadas em impregnação metálica introduzidas por Camillo Golgi, em 1870. Tempos depois com o melhoramento desta técnica, Santiago Ramon y Cajal e Pio del Rio

Hortega classificaram as células da neuroglia como macroglia e uma pequena parte considerada derivada de tecido não nervoso chamada de microglia (KIMELBERG & NOREMBERG, 1989).

A macroglia é subdividida em astrócitos e oligodendrócitos (Figura 3). Os oligodendrócitos são células de corpo celular pequeno com poucos prolongamentos e participam na formação da bainha de mielina que envolve os axônios dos neurônios na substância branca do cérebro (BRAHIC & ROUSSARIE, 2009; BRODAL, 2010). Os astrócitos representam cerca de 40% das células presentes no encéfalo, divididos em dois grupos distintos, protoplasmáticos e fibrosos. Geralmente apresentam corpo celular irregular, prolongamentos relativamente longos, podendo estar associados a vasos, à superfície ventricular e a neurônios (KIMELBERG & NOREMBERG, 1989; OBERHEIM *et al.*, 2012; VERKHRATSKY *et al.*, 2010).

Os endimócitos são células cilíndricas, que revestem as cavidades do encéfalo e o canal central da medula espinhal, formando uma camada única de células que limitam o espaço ventricular do cérebro dos vertebrados (SNELL, 2003; ZHANG *et al.*, 2007). Já as micróglia, são células de corpo pequeno que em situações normais exibem muitas ramificações, denominadas de processos, importantes para o reconhecimento de agentes e condições que possam oferecer risco ao SNC (DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005).

Cerca de 10% das células presentes no SNC são micróglia, sendo considerada a primeira linha de defesa contra patógenos invasores e outros tipos de injúria no tecido cerebral (CARPENTIER *et al.*, 2007; RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). Normalmente as microglia são mobilizadas em processos infecciosos, lesões ou doenças degenerativas do sistema nervoso, apresentam a maioria das propriedades dos macrófagos residentes em outros tecidos, sendo distinguidas de outros tipos de macrófagos do cérebro pela sua localização parenquimal e sua função (BRODAL, 2010).

Astrócitos e microglia são células que estão diretamente ligadas à resposta neuroimune induzida pela infecção viral, sendo partes importantes deste trabalho. Por isso, logo abaixo dedicamos tópicos específicos para cada uma dessas células.

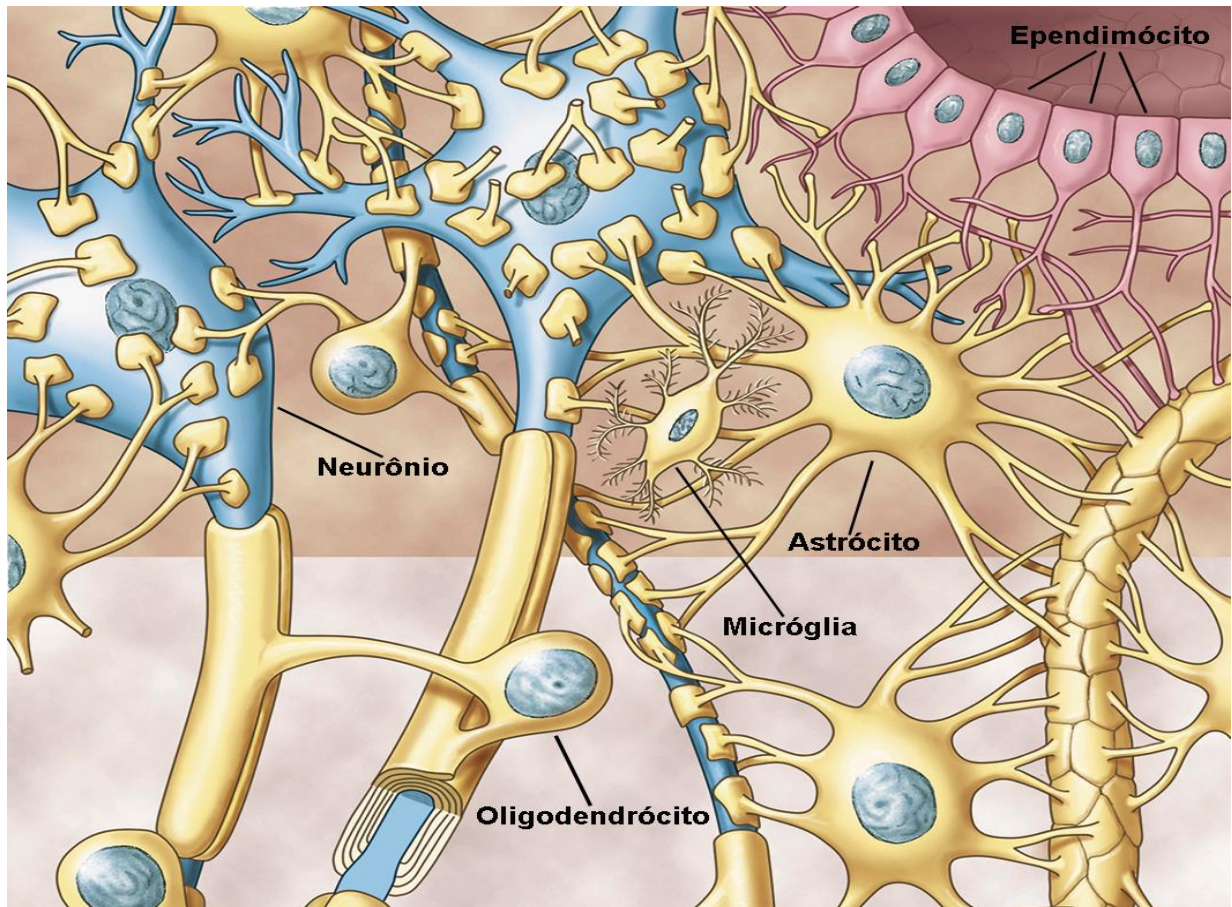


Figura 3: Desenho esquemático mostrando as células gliais: Oligodendrócitos, Ependimócitos, Micróglia, Astrócitos ao redor de um Neurônio.
<http://sistema24.wordpress.com/category/uncategorized/>

1.5.1 Astrócitos

Os astrócitos são o mais abundante tipo celular no cérebro, sendo responsáveis por inúmeras atividades dentro do parênquima cerebral que se iniciam na embriogênese e se mantêm por toda a vida.

Nas últimas décadas houve um grande avanço no entendimento das células astrocíticas. Os astrócitos realizam funções diferenciadas dentro do sistema nervoso central como, por exemplo: manutenção do equilíbrio metabólico e iônico no ambiente neuronal (BENARROCH, 2005; MAGISTRETTI, 2006; VERKHRATSKY, 2010). Um bom exemplo desta função é a tríade formada entre astrócitos e neurônios pré e pós-excitatórios. Essa associação permite que os Astrócitos possam metabolizar os neurotransmissores GABA e glutamato nos terminais sinápticos, transformando-os em

glutamina e protegendo contra possíveis excitotoxicidade causada pelo excesso dessas substâncias nas sinapses. Posteriormente, a glutamina é repassada novamente aos neurônios, os quais podem utilizá-la para renovar seus estoques de neurotransmissores (MARTIN *et al.*, 2000; BENARROCH, 2005; MAGISTRETTI, 2006; VERKHRATSKY, 2010).

Outra característica importante dos astrócitos são as interações com as células endoteliais da vasculatura neurocentral, que permite a regulação do tônus vascular e consequente modulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica, de acordo com as atividades e necessidades neuronais (CARDOSO *et al.*, 2010; GORDON *et al.*, 2007; CARMIGNOTO & GOMEZ-GONZALO, 2010). Os astrócitos também executam funções imunes com papel chave no status neuroinflamatório (FARINA *et al.*, 2007). A literatura tem mostrado que essas funções imunes podem repercutir positivamente na restauração da homeostase cerebral após lesões, e doenças neurodegenerativas (UNGER, 1998; PEKNY & NILSSON, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2009), ou podem ter implicações significativas na progressão de condições patológicas (BENVENISTE, 1998; HENEKA *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ & VERKHRATSKY, 2011).

A proteína ácida fibrilar glial (Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP), a vimentina e a nestina são as principais proteínas de filamentos intermediários encontradas nos astrócitos. Nos primeiros momentos do desenvolvimento, os astrócitos imaturos expressam, principalmente, vimentina e nestina. Durante a maturação dos astrócitos ocorre a diminuição da expressão de nestina e vimentina, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento na expressão da GFAP, que, por isso, é reconhecida como um marcador da diferenciação astrocitária em tecido ou em cultivos celulares (KIMELBERG & NOREMBERG *et al.* 1989, BIGNAMI & DAHL, 1995; GALOU, 1997; MESSAM *et al.*, 2000).

Durante a reação astrocítica ocorre aumento da expressão de GFAP, nos prolongamentos astrocitários, fenômeno conhecido como astrocitose fibrilar reacional, usualmente associada com o aumento do número (hiperplasia) e do tamanho (hipertrofia) dos astrócitos sendo, portanto, um dos produtos característicos observados em condições de patogênese no SNC. Ocorre também recuperação da sua capacidade

de expressar a vimentina, desaparecida durante o desenvolvimento normal do tecido nervoso (GOMES *et al.*, 1999).

Entre os mecanismos de resposta imunológicas desempenhados pelos astrócitos temos, por exemplo, o aumento da expressão gênica para uma série de receptores imunes, tais como receptores Toll-like (TLR), receptores scavenger, receptores do complemento, secreção de várias citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos (FARINA *et al.*, 2007; HASHIOKA *et al.*, 2010),

Entre as citocinas que os astrócitos podem produzir destacamos a interleucina 1 (IL-1), IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, interferon (IFN- α , IFN- β e IFN- γ), fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento transformante (TGF- β) e quimiocinas. É importante ressaltar que a expressão aumentada de citocinas/quimiocinas estão implicadas tanto na progressão como na resolução de doenças (BENVENISTE, 1998; HENRY *et al.*, 2009; HUANG & HENRY, 2008). Outro fator importante é que a liberação desses mediadores pró-inflamatórios pelos astrócitos, estimula a produção de moléculas de adesão vascular, promove atração de células hematogênicas e induz a ativação microglial (DIRNAGL & PRILLER, 2005).

Os astrócitos são as principais células de controle antioxidante no SNC. Por outro lado, astrócitos reativos têm uma redução na sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à diminuição na liberação de enzimas antioxidantes. Nessas condições, os níveis de radicais livres e outros tipos de espécies reativas de oxigênio aumentam significativamente em diversas condições patológicas (RAO *et al.*, 2003). Associado a isso, quando reativos, os próprios astrócitos são mais vulneráveis a desbalanços metabólicos e mitocondriais, o que os tornam também produtores de estresse oxidativo (RAO *et al.*, 2003).

Outra função astrocitária importante que sofre prejuízos funcionais em ambientes patológicos é a sua capacidade de regular os níveis neurotransmissores na fenda sináptica. O resultado deste processo é a elevação da concentração de glutamato extracelular e estimulação excessiva de receptores de glutamato, conhecido como

excitotoxicidade do glutamato, responsável por perda sináptica e morte neuronal (RAO *et al.*, 2003; BENVENISTE, 1998; BRAHMACHARI *et al.*, 2006).

1.5.2 Microglia

As microglias são derivadas de células de tecido mieloide que migraram para o SNC durante o processo embrionário, principalmente pela infiltração de macrófagos mesodermiais (ALLIOT *et al.*, 1999; GINHOUX *et al.*, 2010; NAVASCUES *et al.*, 2000). Uma vez atingido o estágio de diferenciação, essas células terão uma limitada replicação. Existem, no entanto, evidências de aumento da proliferação microglial em caso de lesões neurais (STREIT *et al.*, 1999; WOHL, 2010). Na fase embrionária, as células microgliais fagocitam restos celulares do SNC e produzem fatores que favorecem o crescimento ou a degeneração de neurônios em desenvolvimento (GINHOUX *et al.*, 2010; NAVASCUES *et al.*, 2000).

As microglias são consideradas células do sistema imune residente do SNC, possuindo propriedades imunológicas inatas, sendo ativadas em resposta a traumas, doenças e infecções (DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Sob condições fisiológicas normais, as microglias estão em um estado de vigilância permanente do parênquima cerebral. Sua morfologia é ramificada com processos longos e finos, que exibem considerável motilidade, permitindo o contínuo monitoramento do microambiente ao seu redor (DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005), o monitoramento das sinapses (WAKE *et al.*, 2009), a fagocitose de materiais apoptóticos (TREMBLAY *et al.*, 2010; SIERRA *et al.*, 2010), a poda sináptica (PAOLICELLI *et al.*, 2011), e uma rápida resposta microglial em caso de alterações das condições neurais de normalidade (DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005).

Em condições neuropatológicas, ou mesmo sob estímulo do sistema imune periférico, a ativação da microglia é um dos primeiros mecanismos envolvidos com a defesa do sistema nervoso (DIRNAGL *et al.*, 1999; GODBOUT & JOHNSON 2009). O processo de ativação microglial passa por três diferentes estágios de ativação, inicial, intermediário e avançado, provocando mudanças morfológicas, deixando-a com uma

aparência ameboide e processos encurtados no último estágio de ativação. Além disso, estes estágios também são acompanhados por aumento do processo fagocitário, da apresentação de antígenos, scavenging, ativação do complemento e produção de citocinas inflamatórias (HANISCH & KETTENMANN, 2007). A microglia também recruta e ativa astrócitos para promover a propagação destes estímulos (BLASKO, 2004).

Em condições de ativação microglial o nível de expressão de Iba-1 (*ionized calcium binding adaptor protein-1*) aumenta (ITO *et al.*, 1998; 2001). Iba-1 é uma proteína envolvida na homeostase do cálcio e é muito utilizada como proteína alvo em procedimento de imunohistoquímica para a identificação de microglia e seus processos em secções do tecido encefálico e em culturas primárias. (IMAI, 1996).

Entre as moléculas expressas constitutivamente pelas microglias tem-se uma variedade de citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- α , proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1a, MIP-1b, e proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 (KAUR *et al.*, 2010; KIM & NAGAI, 2010; LYNCH, 2009). As citocinas IL-1 β , IL-6, e TNF- α , por exemplo, são essenciais para indução e manutenção de comportamentos associados a estados de infecção, importantes para a resolução da doença (DANTZER *et al.*, 2001). Quando tratadas com lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de bactérias gram-negativas, uma das respostas microglial é promover o aumento da produção das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , MIP-1a, MIP-1b, e MCP-1, com exceção da expressão de IL-1 β que permanece inalterada (KIM & NAGAI, 2010). Cabe ressaltar também que as microglias ativadas também produzem aumentos nos níveis de citocinas anti-inflamatórias como um mecanismo de retroalimentação negativo (SEO *et al.*, 2004; HENRY *et al.* 2009).

Algumas citocinas e moléculas inflamatórias tais com a IL-1 α/β , TNF- α , IFNs e óxido nítrico (NO), podem induzir a ativação microglial (BENVENISTE, 1998), porém, ainda não há consenso definitivo quanto ao gatilho inicial para a ativação microglial, (NAKAMURA *et al.*, 2002).

A precisa consequência da ativação microglial na sobrevivência da célula neural *in vivo* permanece incerta. Em cultura, a microglia é estimulada a produzir radicais livres, aminoácidos excitatórios, citocinas inflamatórias, bem como fatores tróficos, sugerindo que a atividade microglial tem duplo papel: defesa do organismo e envolvimento nos

processos patológicos (ZHANG, 2003; ROZENFELD *et al.*, 2003). Um mecanismo comumente observado em várias doenças é a produção em excesso de neurotoxinas pela microglia, incluindo NO, TNF- α e espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam à ativação de astrócitos, de outras microglias e, por fim, à morte de neurônios (LEE *et al.*, 2001; KLEGERIS *et al.*, 2007).

1.6 CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO

A reação glial aumenta a expressão gênica de uma variedade de fatores do complemento (FC), citocinas, óxido nítrico e neuropeptídeos, que estão envolvidos tanto na neuroproteção quanto na neurodegeneração (SOLA, 2002). As citocinas são peptídeos liberados durante as fases de ativação efetora da imunidade inata e da imunidade específica, servindo para mediar e regular as respostas imunes de caráter pró-inflamatório ou anti-inflamatório (SHEERAN, *et al.*, 1997, ABBAS, *et al.*, 2012). O gatilho inicial de suas ações se dá através da ligação a receptores específicos presentes em vários tipos de células do organismo, provocando aumento ou inibição da expressão de proteínas, inclusive de outras citocinas. Podem agir no local onde são produzidas, em células próximas ou são secretadas para circulação, com efeitos à distância (SHEERAN, *et al.*, 1997, ABBAS, *et al.*, 2012). A secreção delas é um evento rápido, autolimitado, sendo produzidos por uma variedade de células, macrófagos, adipócitos, hepatócitos, miócitos, entre outras (ABBAS *et al.*, 2012).

Durante o curso de um processo infeccioso agudo ou crônico, é possível que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α) induzam o organismo a criar uma série de respostas fisiológicas e comportamentais caracterizadas por febre, síntese de proteínas pelo fígado, redução da ingestão de água e de alimentos, aumento da liberação de corticosteróides, alteração da atividade cerebral das monoaminas, diminuição da atividade do cotidiano e da interatividade social, além de hiperalgesia. Essas alterações ocorrem na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos, aumentar a proliferação de células imune e conservar energia (HENNESSY *et al.*, 2013; DANTZER, 2001).

A IL-6, por exemplo, expressa por células fagocíticas no início da infecção por alguns patógenos, desempenha múltiplos papéis no sistema imunitário, incluindo a inflamação, hematopoiese, e diferenciação de linfócitos T (LAW, 1996). Outra citocina com um papel crítico na imunidade é o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Vários estímulos patogênicos induzem a expressão desta citocina, importante na iniciação de uma cascata biológica complexa envolvendo citocinas, quimiocinas, recrutamento e ativação de células fagocíticas e linfócitos em locais de lesão e infecção (LOCKSLEY, *et al.*, 2001). Quando o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é expresso por conta de infecção viral, a interação dele com o receptor do tipo I p55 pode induzir apoptose através da ativação de caspase 8 (MICHEAU & TSCHOPP, 2003). Em camundongos infectados pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) foi observado a indução de níveis de TNF- α no soro pela IL-12, bem como a resposta imune específica e a inibição da produção de IL-4 (MANETTI 1993; HSIEH *et al.*, 1993). Sob condições de infecção viral, a IL-12 é essencial para a propagação da resposta imune, ao passo que TNF- α pode otimizar a produção de INF- γ (ORANGE *et al.*, 1996).

A IL-12 é uma citocina proinflamatória secretada por células apresentadoras de antígenos (APCs) e fagócitos, incluindo células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (D'ANDREA *et al.*, 1992; MACATONIA *et al.*, 1995). No SNC, astrócitos e microglias são as principais fontes de IL-12 (CONSTANTINUESCU *et al.*, 1996; STALDER *et al.*, 1997). Já foi demonstrado também a expressão desta citocina derivada de neurônios *in vitro* (IRELAND *et al.*, 2004).

A IL-12, também conhecida como IL-12p70, é uma glicoproteína heterodimérica composta pelas subunidades p35 e p40, que são unidas por ligações dissulfeto (KOBAYASHI *et al.*, 1989; VIGNALI & KUCHROO, 2012; XU *et al.*, 2010). Embora a co-expressão de ambas sub-unidades na mesma célula seja essencial para formar o heterodímero biologicamente ativo (GUBLER *et al.*, 1991; SCHOENHAUT *et al.*, 1992), a produção de cada uma das subunidades é regulada de forma independente. O gene da IL-12p35 é constitutivamente expresso em várias células, porém a expressão de IL-12p40 é restrito às células que podem expressar IL-12. Ao contrário da IL-12p35, a subunidade IL-12p40 é segregada como monomero e homodímero (LING, 1995; GILLESSEN, 1995)

Na imunidade adquirida, o papel primário da IL-12 é dirigir a diferenciação das células CD4+ *T-helper* (Th) para um fenótipo Th1 e essas células são críticas na resposta imune para patógenos intracelular (WOLF *et al.*, 1994). Na imunidade inata, a IL-12 estimula a migração das células Natural Killer (NK) para a região da infecção reforçando sua atividade citotóxica e a produção de IFN- γ (TRINCHIERI *et al.*, 1992), que, por sua vez, suprarregulam a produção de IL-12 por APCs e fagócitos em uma retroalimentação de feedback positivo (KUBIN *et al.*, 1994; MAX *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 1994).

O TGF- β é uma citocina antiinflamatória que em condições fisiológicas no SNC é produzido por neurônios, astrócitos e microglias (LAW *et al.*, 2004; MAKWANA *et al.*, 2007), diminui a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , induz apoptose e inibe a função de APCs, através da diminuição de complexo principal de histocompatibilidade classe dois (MHC II) e moléculas co-estimulatórias. Além disso, essa citocina inibe a atividade de NO-sintase induzida, resultando na supressão da produção de óxido nítrico por macrófagos, e diminui a expressão de mRNA de receptores de quimiocinas em microglias (HARRIS *et al.*, 1995).

Neurônios, células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos, além de astrócitos e microglias ativadas estão entre as células do organismo que produzem constitutivamente NO (BREDET & SNYDER, 1994; CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; CORRADIN *et al.*, 1993). A produção de NO é um mecanismo de defesa imunitária em respostas a ação patogênica de microorganismos, incluindo protozoários, parasitas, fungos, bactérias e vírus (KARUPIAH *et al.*, 1993; SEGUIN *et al.*, 1994; STANGER *et al.*, 1994).

O NO é um produto da conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase – NOS (KUO & SCHROEDER, 1995). Três isoformas de NOS são descritas, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas - cNOS (WONG & MARSDEN 1996). Em condições de normalidade a expressão de iNOS, enzima que produz largas quantidades de NO, não é detectável (CORRADIN *et al.*, 1993; GALEA *et al.*, 1994). Porém, quando há exposição a componentes patogênicos, como o LPS, ou mesmo o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-12, IFN- γ ou TNF- α , ocorre aumento da

expressão gênica de iNOS em astrócitos e microglias (MANDER & BROWN, 2005; CORRADIN *et al.*, 1993; GALEA *et al.*, 1994). A IL-12, por exemplo, promove a indução de iNOS em neurônios, levando à redução do título do VSV (KOMATSU *et al.*, 1999a).

Ao que parece o NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (JAMES, 1995; MONCADA, S. *et al.*, 1991).

A produção de NO parece inibir a replicação viral possivelmente pelo efeito direto sobre o vírus e as células hospedeiras. O NO danifica o DNA viral e/ou liga íons metálicos às proteínas virais que são essenciais à replicação viral (NGUYEN *et al.*, 1992; RICE *et al.*, 1993; WINK *et al.*, 1991). Esses efeitos do NO foram evidenciados, por exemplo, em infecções virais por VSV, ectromelia, vaccinia e herpes simples tipo 1 (BARNA *et al.*, 1996; BI *et al.*, 1995; KARUPIAH *et al.* 1998; POPE *et al.* 1998).

O bulbo olfatório é uma das poucas áreas do SNC adulto onde a NOS neuronal é rapidamente expressa (BREDET *et al.*, 1990). A expressão constitutiva de NOS em neurônios olfatórios declina após o nascimento, mas são rapidamente induzidos após a injúria (ROSKAMS *et al.*, 1994).

A produção de NO via microglia parece constituir um dos mais importantes eventos da imunidade inata do SNC contra a infecção de VSV. Alguns estudos demonstraram que o aumento da expressão de iNOS microglial coincide com a diminuição da titulação viral (BI & REISS, 1995). O aumento da expressão de NO é um importante fator para o controle inicial da infecção por VSV, antes que respostas imunes específicas se desenvolvam. Contudo, uma expressão elevada de iNOS pode levar a um aumento exagerado na produção de NO que, em determinadas condições, pode destruir neurônios, inibindo alguns mecanismos intracelulares necessários para a sobrevivência dessa célula (MANDER & BROWN, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

A aplicação de um modelo experimental de infecção pelo vírus Marabá em animais adultos de laboratório pode propiciar valiosas informações quanto a presença do vírus nas diferentes regiões do SNC, possíveis danos celulares provocados pela infecção, reatividade glial, aumento da expressão de moduladores inflamatórios e NO, que podem servir de parâmetros para comparação com a infecção produzidas por outros vírus, ou condições neuropatológicas, em animais ou mesmo em humanos.

A resposta imunológica contra patógenos invasores conta com o envolvimento tanto de células do sistema imune inato quanto do adaptativo. As microglias e astrócitos estão envolvidas na primeira linha de defesa contra patógenos invasores, pois através de suas funções básicas eles respondem rapidamente à invasão, aumentando a expressão de citocinas, quimiocinas e NO e ROS, que, por fim, promovem aumento do status pró-inflamatório e aumentam o stress oxidativo no SNC, que tomados em conjunto podem ajudar na eliminação do vírus, ou quando a resposta é exagerada, provocar danos ao SNC.

Portanto, a análise da neuropatologia induzida pelo Vírus Marabá em camundongos adultos Balb/c, irá traçar um perfil de distribuição do vírus e das lesões no parênquima encefálico, além de demonstrar aspectos da resposta imune no SNC induzidas pela infecção com o vírus em estudo. Os resultados obtidos neste trabalho irão fornecer subsídios para estudos futuros que tenham como objetivo o controle da progressão da infecção pelo vírus Marabá, ou de outra espécie do gênero VSV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar aspectos da neuropatologia induzida pelo vírus Marabá em camundongos adultos, a partir da análise histopatológica, imunohistoquímica e de mediadores inflamatórios.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as alterações histopatológicas do encéfalo dos animais infectados pelo vírus Marabá;
- Identificar as regiões encefálicas infectadas pelo vírus Marabá em camundongos adultos;
- Analisar qualitativamente a ativação de microglias e astrócitos a partir de sua morfologia nos animais infectados pelo vírus Marabá;
- Quantificar a expressão de citocinas e NO em animais infectados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (CEUA) do IEC e foi aprovado sob parecer Nº 0004/2013/CEUA/IEC/SVS/MS, além disso, todos os procedimentos tiveram a observância das normas e critérios pré-estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança, quanto aos procedimentos de isolamento e técnicas destinadas à utilização de agentes infecciosos pertencentes ao nível de biossegurança 3.

Nos procedimentos que envolvem a manipulação dos vírus foram utilizados os equipamentos de proteção individual – EPIs (óculos, jalecos, luvas, máscara) e os equipamentos de proteção coletivos – EPCs (câmara de fluxo laminar de classe II A2). Materiais biológicos desprezados (carcaças de animais, restos de culturas celulares) foram acondicionados em recipientes apropriados, esterilizados em autoclave e enviados para a incineração.

4.2 CEPA VIRAL

Amostras do VÍRUS MARABÁ (BE AR 411459) foram fornecidas pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SEARB) do Instituto Evandro Chagas.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 210 camundongos Balb/c provenientes da colônia do Biotério Central do Instituto Evandro Chagas conforme quadro abaixo. Os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IEC em gaiolas plásticas de tamanho padrão (32x39x16cm) com água e comida *ad libitum*, sob a temperatura aproximadamente 23°C e ciclo claro-escuro de 12h/12h.

Os animais que foram utilizados nos procedimentos de Histopatologia, Imunohistoquímica, detecção de citocinas e NO foram divididos em grupos controles (Ac) grupos infectados (Ai) inoculados.

Quadro 1: Procedimentos experimentais e número de animais

TÉCNICAS	ANIMAIS (CAMUNDONGOS)	Nº DE ANIMAIS
TITULAÇÃO VIRAL	Neonatos com 2dias de idade	60
ESTOQUE VIRAL	Neonatos com 2dias de idade	30
PRODUÇÃO DE SORO HOMÓLOGO	Machos adultos	30
HISTOPATOLOGICA	Fêmeas com 56 dias de idade (em média)	30
IMUNOHISTOQUÍMICA	Fêmeas com 56 dias de idade (em média)	20
DETECÇÃO DE CITOCINAS E NO	Fêmeas com 56 dias de idade (em média)	40
TOTAL DE ANIMAIS USADOS		210

4.4 PRODUÇÃO DO INÓCULO E DO ESTOQUE VIRAL

Suspensões de cérebro de camundongos infectados com o espécime viral e não infectados na diluição de 1:10, foram inoculadas em camundongos BALB/c recém-nascidos por via intracerebral (i.c.). As suspensões de cérebro de camundongos infectados e não infectados foram feitas a partir da maceração de cérebro de camundongo em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 contendo albumina bovina a 0,75%, estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 UI/mL), (v/v). O macerado foi centrifugado a 5.000 g durante 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para recipientes apropriados e 0,02 mL desta suspensão (1:10) foi inoculado com seringa hipodérmica no cérebro de camundongos.

Os animais infectados e controles foram observados 2 vezes ao dia (em intervalos de aproximadamente 12 horas). Após manifestação dos sinais de doença (dificuldade de alimentação, falta de coordenação motora, tremores) os animais foram sacrificados, identificados e congelados à -70°C para compor o estoque viral e posteriormente serem utilizados nos experimentos.

4.5 TITULAÇÃO DO VÍRUS

A titulação viral foi realizada a partir do preparo de diluições seriadas de dez vezes (de 10^{-1} a 10^{-8}) da suspensão viral, seguido de inoculação via i.c. de 0,02 mL em camundongos recém-nascidos. O título foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02$ mL (dose letal capaz de matar 50 % dos camundongos infectados).

4.6 SORO HOMÓLOGO

Os antígenos imunizantes foram preparados a partir de suspensão de cérebros de camundongos infectados, na proporção de 1:10, em solução salina (NaCl) a 0,85%. O esquema de imunização consistiu de quatro injeções intraperitoneais (i.p.) em camundongos machos adultos, administradas com intervalos de sete dias (durante quatro semanas), na quantidade de 0,2 mL por camundongo. O soro foi obtido após um intervalo mínimo de sete dias da última dose administrada. Os animais foram anestesiados e sangrados por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 1370g durante 10 minutos, e soro coletado e conservado a -20°C . Foram utilizados 30 animais nesta etapa do trabalho.

Para o processo de adsorção do anticorpo um animal é anestesiado e eutanasiado por anestesia profunda com halotano, o cérebro é retirado, pesado e macerado, depois homogeneizado com PBS 0.1M, BSA a 10%, penicilina a 200UI/ml e estreptomicina a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respeitando a diluição de 1:5. O homogeneizado é centrifugado por 15 minutos a 8.000 RPM a uma temperatura de 4°C , terminado o tempo coleta-se o sobrenadante. A este sobrenadante é adicionado soro homólogo na proporção de 1:1, de acordo com a necessidade do experimento a ser realizado, e a mistura é mantida a temperatura de 10°C por 12hs. Após esse período a mistura é centrifugada novamente por 15 minutos a 9800g a uma temperatura de 10°C e o sobrenadante colhido para ser utilizado como anticorpo primário para marcação do antígeno viral no procedimento de imunohistoquímica.

4.7 PERFUSÃO E CRANIOTOMIA

Após os tempos avaliados em cada procedimento, os animais foram anestesiados com tribromo-etanol intraperitoneal (0,1ml/5g de peso corporal) e perfundidos por via intracardiaca com solução salina a 0,9%, pH 7,2, contendo heparina, seguida de solução fixadora contendo 4% de formaldeído nascente em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,2, a temperatura ambiente. Após perfusão, a calota craniana foi removida para a retirada do cérebro, o qual foi imerso na mesma solução fixadora por 48 horas. Os encéfalos retirados e seccionados em micrótomo de lâmina vibratória (Micron HM 650 V) em fatias de 80 µm de espessura, e estocados em paraformaldeído a 2% (imunohistoquímicas).

4.8 PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO

Os camundongos (oito semanas de idade) foram divididos em grupo de Ai e grupo de Ac, inoculados por via i.n. com 0,02mL em cada narina, de uma suspensão de encéfalo de camundongo infectados com o vírus Marabá e de camundongo normal respectivamente, na proporção de 1:1000. Após 2, 4 e 6 dias da inoculação, três animais de cada grupo (Ai e Ac) foram anestesiados com tribromo-etanol intraperitoneal (0,1ml/5g de peso corporal) e submetidos aos procedimentos de perfusão e craniotomia, conforme descrito no item 4.7. Ao final desse período, foram realizadas três lavagens com PBS, pH 7,2, a temperatura ambiente, seguida da desidratação em diluições crescentes de etanol (50%, 70%, 90%, e 100%), com três passagens em xilol a temperatura ambiente e imersão em dois banhos de parafina a 60°C. O processamento foi finalizado com a inclusão das amostras em blocos de parafina.

Os blocos foram seccionados com o auxílio de micrótomo rotativo (Leica - Suíça), obtendo-se cortes coronais com espessura de 5µm. Por fim, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina, seguida da observação ao microscópio óptico (Axiophot - Zeiss) e obtenção das imagens com máquina digital (AxioCam HRC - Zeiss).

4.9 PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICOS

Foram utilizadas reações de imunohistoquímica para identificação dos antígenos do vírus Marabá, de astrócitos e microglias no parênquima cerebral. Para isso, foram utilizados camundongos Balb/c de oito semanas em média, sendo que os mesmos foram divididos em grupos de animais infectados (Ai) inoculados com homogeneizados de macerado de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá, e animais controles (Ac) inoculados com homogeneizado de macerado de cérebro normal, na proporção de 1:1000. Posteriormente, em 3 e 6 dias pós-inoculação (d.p.i.), cinco animais de cada grupo foram submetidos ao procedimento perfusão e craniotomia, conforme descrito no item 4.7.

4.9.1 Imunohistoquímica para os antígenos virais e para GFAP

Para identificar a presença dos antígenos virais e astrócitos reativos em secções fixadas foram empregadas técnicas imunohistoquímicas utilizando anticorpos específicos contra o vírus Marabá e contra proteína ácida fibrilar glial (GFAP) respectivamente. Foram realizados os seguintes passos para ambos os processos:

As secções foram tratadas com ácido bórico 0,2M, pH 0.9 a 70° C por uma hora. Depois deste processo, foi realizado somente para as amostras para imunohistoquímica de anti-GFAP a incubação em Tris-EDTA durante 12h. Em seguida os cortes foram permeabilizados e lavados com Salina tamponada fosfatada + Triton 5% (PBST) e Salina tamponada fosfatada (PBS) respectivamente por três vezes de cinco minutos. Terminada a lavagem as secções foram colocadas em uma solução para bloqueio de sítios inespecíficos, feito com o componente *MOM IgG Blocking Reagent* (12 gotas *Stick Solution Mouse IG Blocking Reagent* + 15 ml TBS) por uma hora. Então os cortes foram novamente lavados com PBS por três vezes de cinco minutos, para em seguida serem incubados por 72h na solução contendo o anticorpo primário específico para cada amostra: Anti-Marabá cuja diluição do anticorpo foi de 1:50 na solução de concentrado proteico (500µl do anticorpo/25ml de concentrado proteico); ou anti-GFAP cuja diluição do anticorpo foi de 1:800 (18,75µl de GFAP + 15 ml de concentrado de

proteína). O concentrado proteico, também conhecido como solução de trabalho, foi feito com 1200µl de concentrado de proteína + 15 ml de PBS.

Terminada a incubação no anticorpo primário os cortes receberam novamente uma lavagem em PBS por três vezes de cinco minutos, e foram colocados em incubação em uma solução de 60 µl de *Biotinylated IgG* (Kit MOM *IgG Biotinylated Anti-mouse IgG*) em 15000 µl (15ml) da solução de trabalho por 12h.

O passo seguinte foi a lavagem das amostras em PBS por três vezes de cinco minutos, para em seguida serem incubadas por 10 minutos em uma solução de 0,3% de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) em PBS para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Em seguida ocorreu a lavagem com PBS por três vezes de cinco minutos, quando, então, são incubados em solução ABC (complexo biotina avidina) - 2,5ml de PB 0,1M + uma gota da solução de avidina + 1 gota da solução de biotina, ambos do Kit MOM, por uma hora. Terminada esta etapa, os cortes são lavados em PB 0,1M por três vezes de cinco minutos. Antes da revelação com GND (Glucose oxidase/ Níquel/ DAB) as secções são incubadas com Tampão Acetato 0.2M pH 6.0 por cinco minutos., para em seguida ser colocados na solução de GND para revelação. Para interromper a reação foi utilizado PB 0,1M.

Este processo de revelação da peroxidase presentes nos sítios de ligação antígeno – anticorpo foi realizada seguindo-se o protocolo para intensificação da reação utilizando Níquel/glicose oxidase/diamino benzidina (SHU et al., 1988).

A precipitação do cromógeno intensificado pelo Níquel se dá após a reação enzimática empregando glicose oxidase (enzima que quebra a glicose), α-D-glicose (substrato) e Cloreto de amônia (co-fator). Para preparo da solução de glicose-oxidase/ Diaminobenzidina/ Níquel foram utilizadas as seguintes etapas:

- a) Solução A: 50mg/ml de sulfato de Níquel em tampão acetato a 0,2M e pH de 6.0;
- b) Solução B: 0,5 mg/ml de DAB em água destilada;
- c) Adiciona a solução A na Solução B e acrescenta 4mg/ml de α-D-glicose e 0,8 mg/ml de cloreto de amônia à solução final.
- d) A solução final é adicionada às secções e após 3 minutos acrescenta-se, aproximadamente, 1mg/ml de glicose oxidase à mistura, continuando o acréscimo

em intervalos de 10 minutos. A reação é interrompida no trigésimo minuto de reação, realizando-se 3 lavagens com tampão fosfato a 0,1M e pH de 7,2 a 7,4.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos à temperatura ambiente e, posteriormente, desidratados em álcool em várias concentrações (70, 80, 90 e 100%), para então serem diafanizados em xileno e montados entre lâmina/lamínula com Entellan (Merk - Alemanha), analisados em microscópio óptico de campo claro (Axiophot – Zeiss) e fotografados com câmera digital (AxioCam HRC – Zeiss).

4.9.2 Imunohistoquímica para revelação de microglia ativada

A proliferação e ativação microglial em secções fixadas em paraformaldeído, foi avaliada usando anti-Iba-1 (ionized calcium binding adaptor protein-1). O protocolo utilizado possui as mesmas etapas dos procedimentos para marcação do antígeno viral e de GFAP acima descritos, alterando-se apenas as seguintes soluções e reagentes:

- Tris salina Triton 5% (TBST) para permeabilização das amostras;
- Tris salina tamponada (TBS) para lavagem do material;
- O anticorpo primário anti-Iba-1 (diluição de 40µl de Iba-1 + 16 ml de TBS)
- Solução de caseína (1ml de caseína + 10ml de água destilada) para bloqueio dos sítios inespecíficos;
- O anticorpo secundário *salstok Biotinylated Anti-Rabbit IgG* (90 µl de Biotinylated IgG em 18000 µl da solução de trabalho - 1200 µl de concentrado de proteína + 15 ml de PBS).

4.10 TESTES PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS E NO

4.10.1 Preparo do homogeneizado de cérebros de camundongos

Camundongos BALB/c com média de 8 semanas de idade, foram divididos em grupo de Ai e grupo de Ac e inoculados por via i. n. com 10 μ L em cada narina. A solução inoculada foi feita a partir de suspensões de cérebros de camundongos infectados com o espécime viral em estudo e de suspensões de cérebro de camundongo normal, respectivamente, na proporção de 1:1000, preparadas conforme descrito no item 4.4. Os animais infectados e controles foram identificados e congelados à -80°C com 3 e 6 d.p.i. Em seguida, foi feita a maceração dos cérebros desses camundongos em tampão PHEM 2X na proporção de 1:5 para serem utilizados nos experimentos de detecção de citocinas e NO.

4.10.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA do tipo sandwich)

Essa técnica foi realizada conforme instruções do fabricante do kit (BD OptEIA™ -BD Biosciences-EUA). Para analisar a expressão das citocinas IL-12p₄₀, TGF- β 1 foram utilizados homogeneizados de encéfalo de camundongos adultos albinos da linhagem BALB/c infectados e do grupo controle sacrificados em 3 e 6 dias pós-inoculação.

Placas de 96 poços foram incubadas com anticorpo de captura específico para cada citocina, overnight a uma temperatura de 4°C. As placas sensibilizadas foram lavadas com uma solução contendo PBS e Tween 20 a 0,05% e depois incubadas com 200 μ L de uma solução de bloqueio composta de PBS e 10% de soro bovino fetal (SBF) por um período de uma hora a temperatura ambiente.

As placas foram novamente lavadas como descrito anteriormente, seguida da adição dos sobrenadantes das suspensões dos encéfalos de camundongos e das diluições seriadas da curva padrão; e incubação por duas horas em temperatura ambiente – para a quantificação da citocina TGF- β 1, as amostras foram previamente tratadas com ácido clorídrico (HCl) por uma hora e depois neutralizadas com hidróxido de sódio (NaOH). Após esse intervalo, as placas foram lavadas cinco vezes e

incubadas com anticorpo de detecção biotilado acrescido de estreptavidina ligada a peroxidase por um período de uma hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com o cromógeno (TMB - Tetrametilbenzidina) por 15-30 minutos a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após incubação, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2N e analisada na leitora de ELISA Modelo EL 800 - BIO-TEK com filtro de 450nm.

4.10.3 Citometria de Fluxo

Essa técnica foi realizada conforme instruções do fabricante do kit (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammatory - BD Biosciences-EUA). Para analisar a expressão das citocinas IL-6, TNF, IFN-γ, IL-12p70, IL-10 e MCP1 foram utilizados sobrenadantes de homogeneizados de encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c adultos infectados e do grupo controle, sacrificados em 3 e 6 dia pós-inoculação.

As amostras e as diluições seriadas da curva padrão foram colocadas em tubos apropriados devidamente identificados contendo os anticorpos de captura de detecção das citocinas mencionadas acima, incubados por duas horas e, após esse período, foi acrescentado o tampão de lavagem para aumentar o volume das amostras e facilitar a leitura. Os tubos contendo as amostras foram levados ao citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) para a leitura dos resultados. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software FCAP Array 3.0.

4.10.4 Reagente de Griess para Quantificação de Nitrito

Essa técnica foi realizada conforme instruções do fabricante do kit (Molecular Probes, EUA), com algumas modificações. Para quantificação de nitrito, formado pela oxidação espontânea de NO sob condições fisiológicas.

Os animais foram divididos em grupo de Ai e grupo de Ac e inoculados por via i. n. com 20µL – 10µL em cada narina – de suspensões de cérebros de camundongos

infectados com o espécime viral em estudo e de suspensões de cérebro de camundongo normal, respectivamente, na proporção de $1:10^{-3}$, preparadas como descrito no item 4.4. Os animais de ambos os grupos foram sacrificados em 3 e 6 dias pós-inoculação. O limite de detecção para esse método é de $1,0 \mu\text{M}$ de nitrito.

Foram colocados $50 \mu\text{L}$ de cada sobrenadante das suspensões de encéfalo de camundongos em uma placa de 96 poços, juntamente com $50 \mu\text{L}$ das diluições previstas no kit em tampão apropriado para produzir a curva padrão. Em seguida, nos poços que continham as amostras biológicas e as diluições seriadas da curva padrão foram adicionados $50 \mu\text{L}$ do reagente de Griess, anteriormente preparado com volumes iguais do componente A (*N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) e do componente B (ácido sulfanílico), incubando a placa por uma hora a temperatura ambiente. A amostra de referência fotométrica foi preparada misturando-se $50 \mu\text{L}$ do reagente de Griess e $50 \mu\text{L}$ de água deionizada. Após incubação, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de comprimento de onda de 550nm .

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Três experimentos realizados para analisar quantitativamente a produção de citocinas e nitrito em homogeneizado de encéfalos de camundongos infectados e não infectados. A partir dos resultados será feita análise estatística no software GraphPad Prism 5 utilizando o teste ANOVA *Two-way*, pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANIMAIS INFECTADOS COM O VÍRUS MARABÁ

Os animais inoculados com o vírus Marabá via i.c., 18 horas pós-inoculação (p.i.), apresentaram sinais de infecção caracterizados por hipoatividade progressiva, tremores nas extremidades, hipodesenvolvimento e dificuldade de movimento e de alimentação. O título viral do estoque ficou em torno de 9,6 DL₅₀/0,02 mL.

5.2 RESULTADOS DOS TESTES HISTOPATOLÓGICOS

O Ac de 2, 4 e 6 d.p.i. e os Ai 2 e 4 d.p.i. não apresentaram evidências de alterações histopatológicas (dados não mostrados).

Os Ai 6 d.p.i. demonstram inflamação aguda e crônica no septo interventricular e substância branca adjacente ao córtex das regiões occipital e fronto-parietal. Células picnóticas estavam presentes em várias regiões encefálicas. Foi observado ainda edema perivascular em várias regiões encefálicas e sinais intensos de celular no bulbo olfatório. (dados não demonstrados).

5.3 DETECÇÃO DE ANTIGENOS VIRAIS

Os ensaios imunohistoquímicos para detecção dos antígenos virais demonstrou a presença do vírus Marabá em camundongos inoculados por via intranasal 3 d.p.i no bulbo olfatório, córtex olfatório primário, córtex pré-límbico e córtex infra-límbico (Figura 4C, D). As Figura 4A,B são de animais controles 3 d.p.i. demonstrando o parênquima cerebral sem marcações inespecíficas.

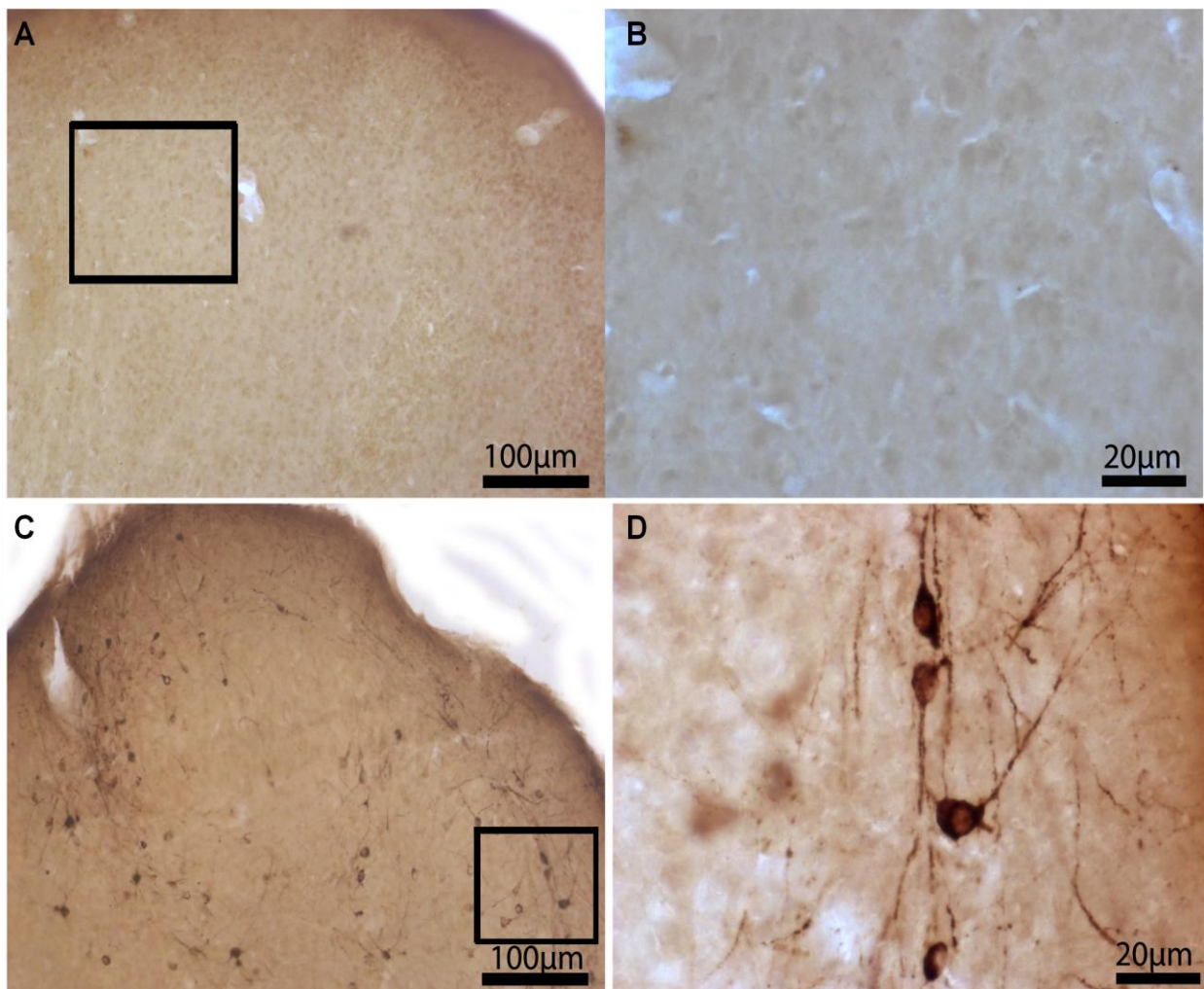


Figura 4: Fotomicrografias de secções de cérebro de camundongo controle 3 d.p.i. (A - B), de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 3d.p.i. (C - D), processados por imunohistoquímica para marcação do antígeno viral: **A:** cortex frontal próximo ao córtex olfatório primário de animal controle 3 d.p.i., **B** – mesma região com aumento de 40x.; **C** - cortex pré-límbico de animal infectado 3.d.p.i.; **D** – mesma região com aumento maior.

As secções de cérebro de camundongo infectado 6 d.p.i. apresentaram intensa marcação de antígenos virais disseminada por todo o encéfalo principalmente no bulbo olfatório, córtex cerebral, lobo olfatório, plexo coroide, septo interventricular, camada de células endoteliais dos ventrículos laterais, terceiro e quarto ventrículo, núcleo acumbens hipocampo, cápsula interna e externa, giro denteado, núcleos da base, tálamo, cíngulum, corpo caloso, tronco encefálico, cerebelo e meninges de várias regiões encefálicas. As Figura 5C, D, E, F mostram a presença dos antígenos virais no

córtex frontal (5C,D) e região do corpo estriado (5E,F) . As figura 5A,B são micrografias sem marcação inespecíficas em Ac de 6 d.p.i..

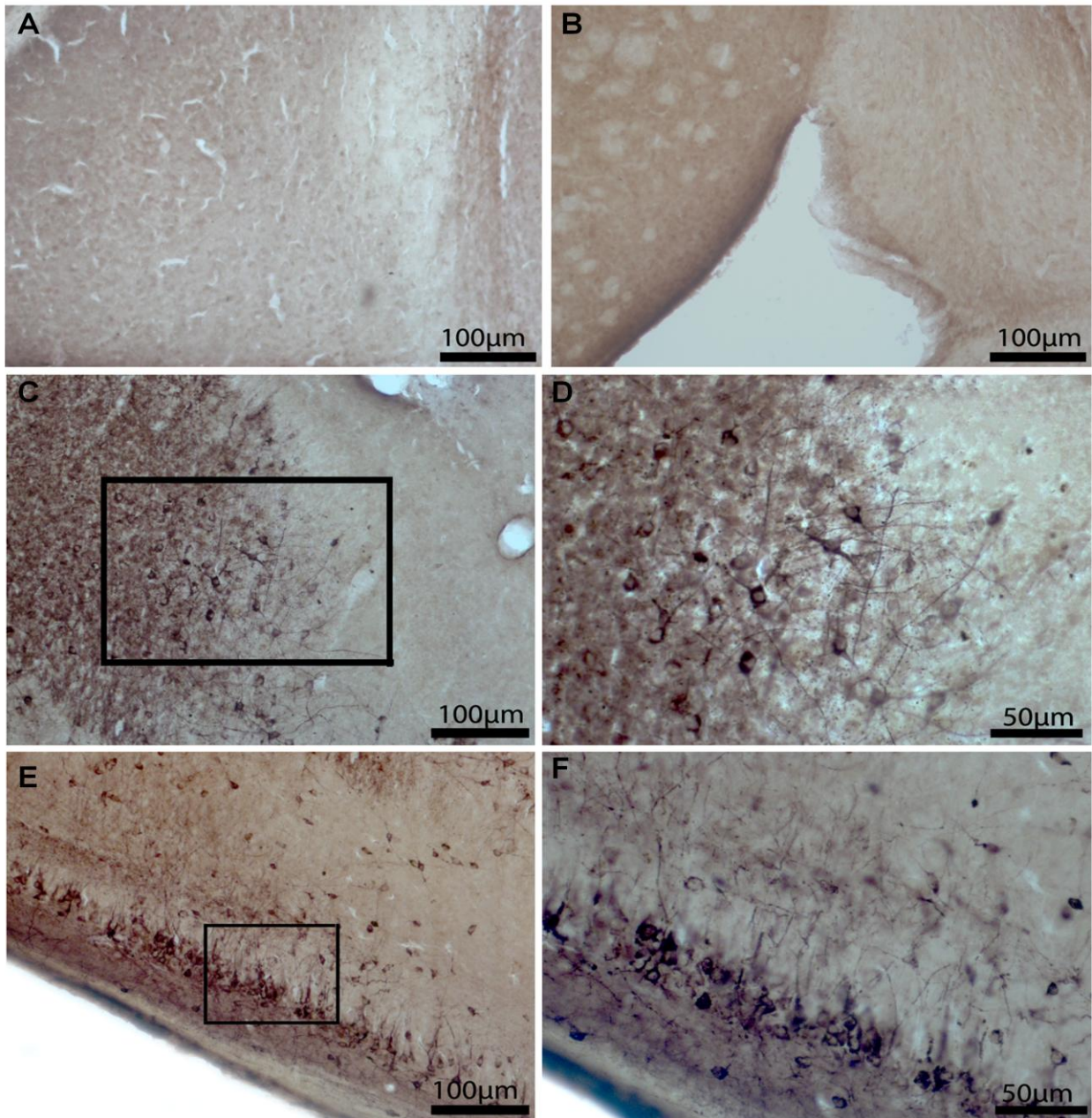


Figura 5: Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 6 d.p.i. (C, D, E, F) processados por imunohistoquímica para marcação do antígeno viral. **A** - Córtex frontal de animal controle sem marcação do antígeno viral; **B** – Corpo estriado e área septal de animal controle sem marcação; **C** marcação do antígeno viral no córtex frontal; **D** – Maior aumento de C; **E** – Marcação do antígeno viral no corpo estriado próximo ao ventrículo lateral; **F** - mesma região com aumento maior.

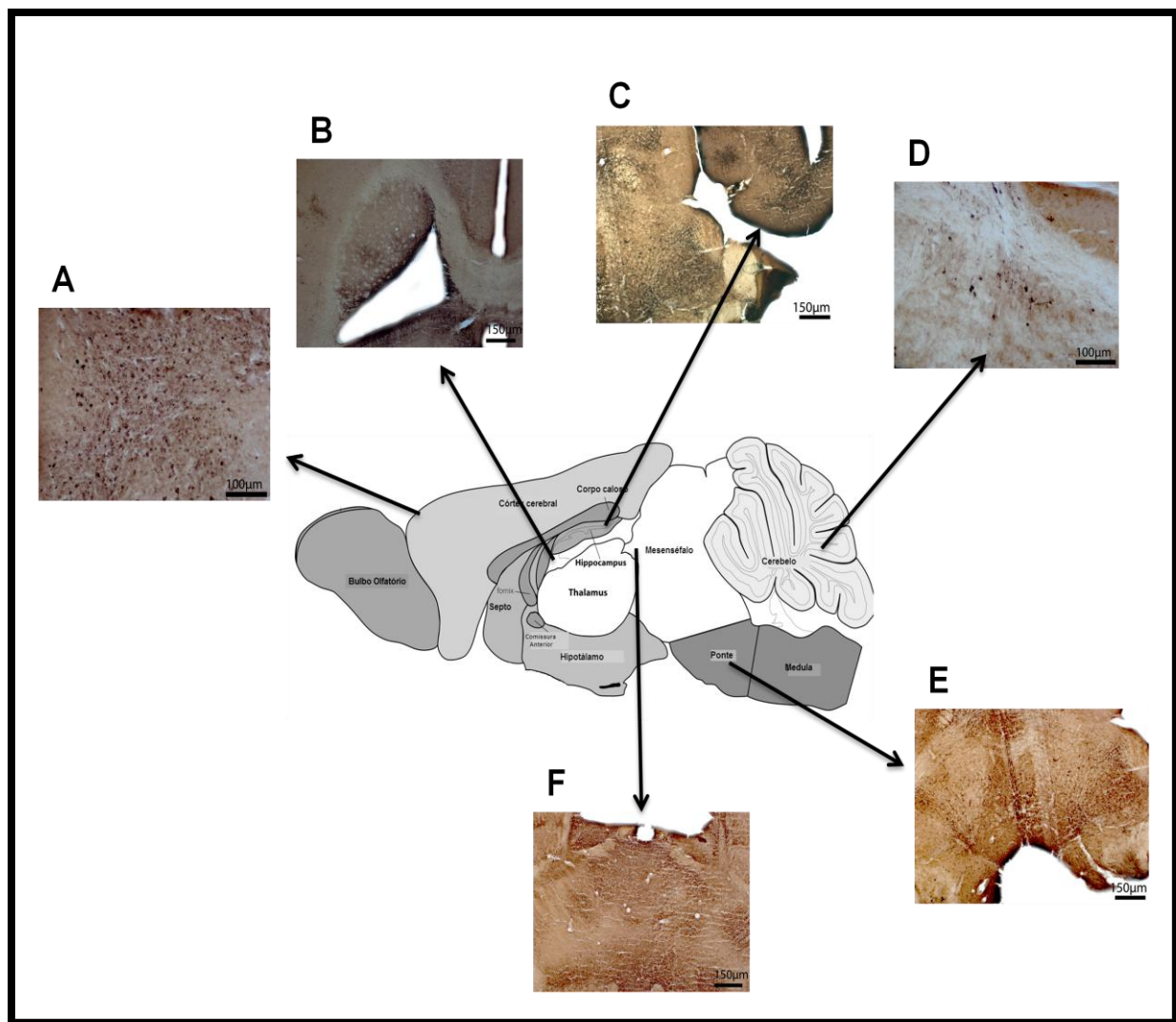


Figura 6: Desenho esquemático de um encéfalo em corte sagital com delimitação de algumas regiões e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado 6 d.p.i., mostrando algumas das regiões encefálicas com marcação do antígeno viral. **A** - Córtex olfatório primário; **B** - Regiões adjacentes ao ventrículo lateral com marcação do antígeno viral (corpo estriado, CA3 do hipocampo, Septo interventricular); **C** - Hipocampo. Giro dentado e córtex entorrinal; **D** - Marcação do antígeno viral no cerebelo; **E** - Marcação do antígeno disseminada no tronco encefálico; **F** - Regiões talâmicas abaixo do ventrículo lateral.

5.4 DETECÇÃO DE MICROGLIA

Nas secções encefálicas processadas para detecção de Iba-1 nos animais do grupo infectado 3 d.p.i, foram observadas marcações de microglias com processos mais curtos e espessos e soma hipertrófico, morfologia esta compatível com a de células ativadas. Microglias com aspecto ativado foram mais observadas no bulbo olfatório e em cortex.olfatório primário, córtex pré-límbico e córtex infra-límbico.(Figura 7C, D). Por outro lado em animais do grupo controle foram observadas células com processos

longos e delgados e soma menor quando comparado com as micróglias ativadas (Figura 7A, B).

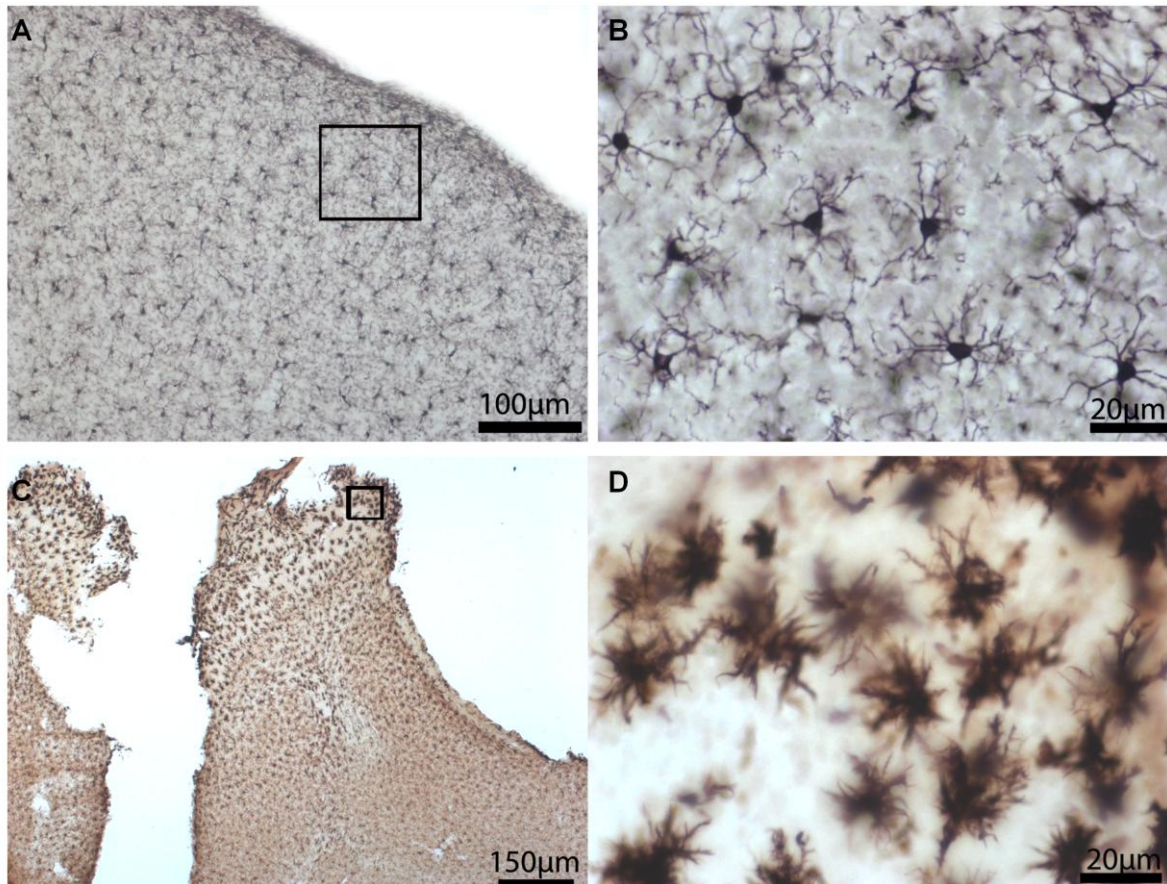


Figura 7: Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 3d.p.i. (C – D), processados por imunohistoquímica para marcação de Iba-1. **A** – região de córtex olfatório primário de animal controle 3 d.p.i.; **B** – foto anterior em aumento maior; **C** – Evidente ativação microglial no bulbo olfatório de animal infectado 3 d.p.i.; **D** – Maior aumento de C, mostrando microglias em estado de ativação.

Os animais controles 6 d.p.i como esperado não apresentaram microglias em estágios de ativação (Figura 8A,B). Já os camundongos infectados com o vírus 6.d.p.i., demonstraram marcação indicadora de ativação microglial em várias regiões encefálicas, incluindo bulbo olfatório, córtex olfatório anterior (Figura 8C,D,E), septo interventricular, corpo estriado, tálamo, hipocampo, giro denteado (Figura 8F,G), tronco encefálico, cerebelo e córtex. Além disso, neste período de infecção (6 d.p.i.) a imunomarcação também ocorreu em muitas células amebóides e globulares presentes

nas mesmas regiões que apresentavam microglia ativada, porém em maior quantidade nas camadas corticais adjacentes à pia-máter e na própria superfície pial. A localização das microglias ativadas em geral coincidiu com localização da marcação do antígeno viral.

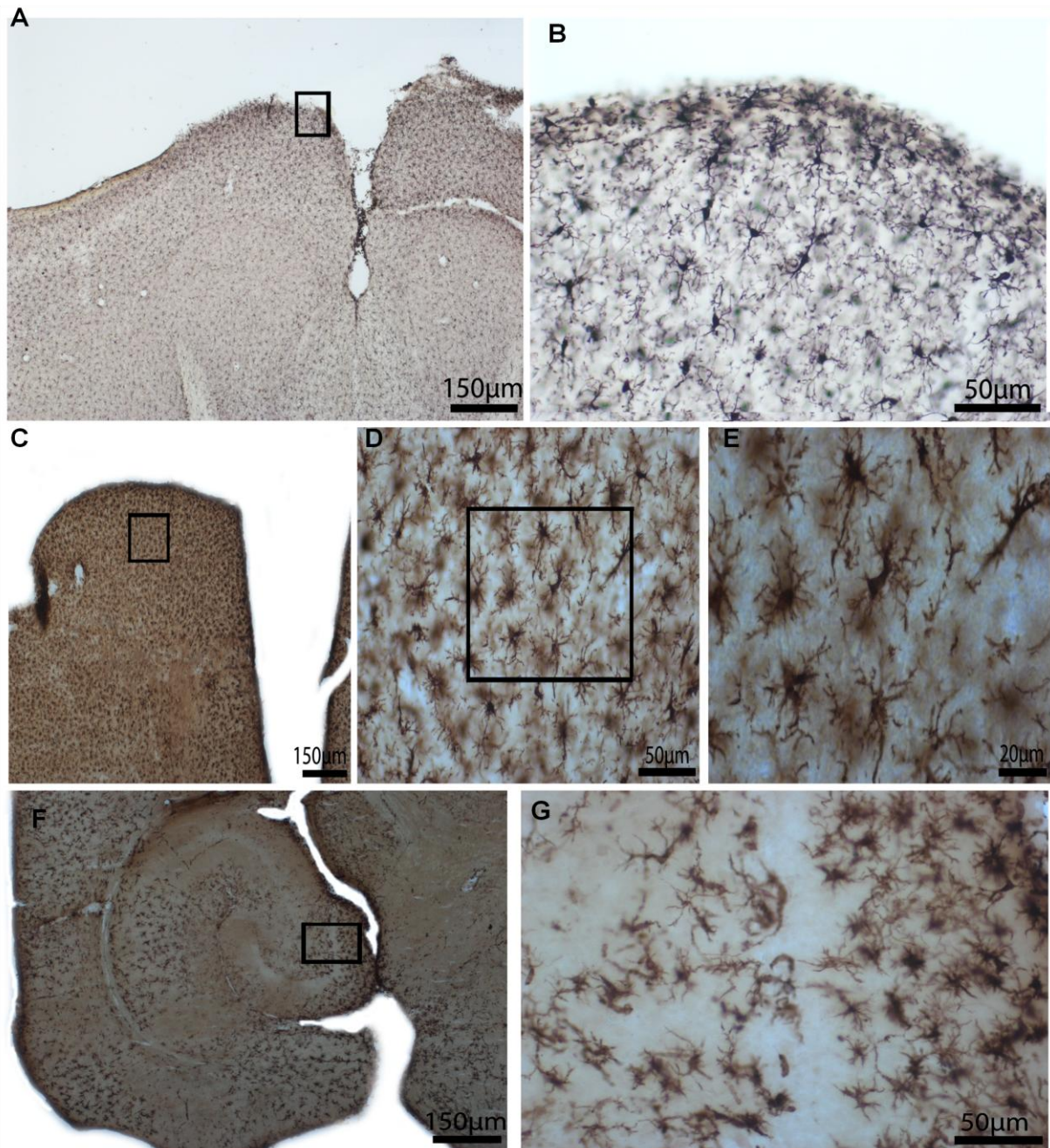


Figura 8: Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 6 d.p.i. (C, D, E, F,G) processados por imunohistoquímica para Iba-1. **A** - Núcleo olfatório anterior mostrando microglias sem ativação; **B** - Aumento de A; **C** - Região do núcleo olfatório anterior; **D** - Aumento de C mostrando ativação microglial; **E** - Aumento de D; **F** - Ativação microglial nas camadas moleculares e polimórfica do do giro dentado; **D** - maior aumento de C.

5.5 – DETECÇÃO DE ASTRÓCITOS

A imunohistoquímica para detecção de GFAP não revelou marcação de astrócitos reativos nos animais do grupo controle de 3 d.p.i. (Figura 9A, B). Quanto aos animais dos grupos infectados com os vírus Marabá 3 d.p.i a presença de astrócitos reativos no encéfalo foi observada apenas no bulbo olfatório (Figura 9C, D).

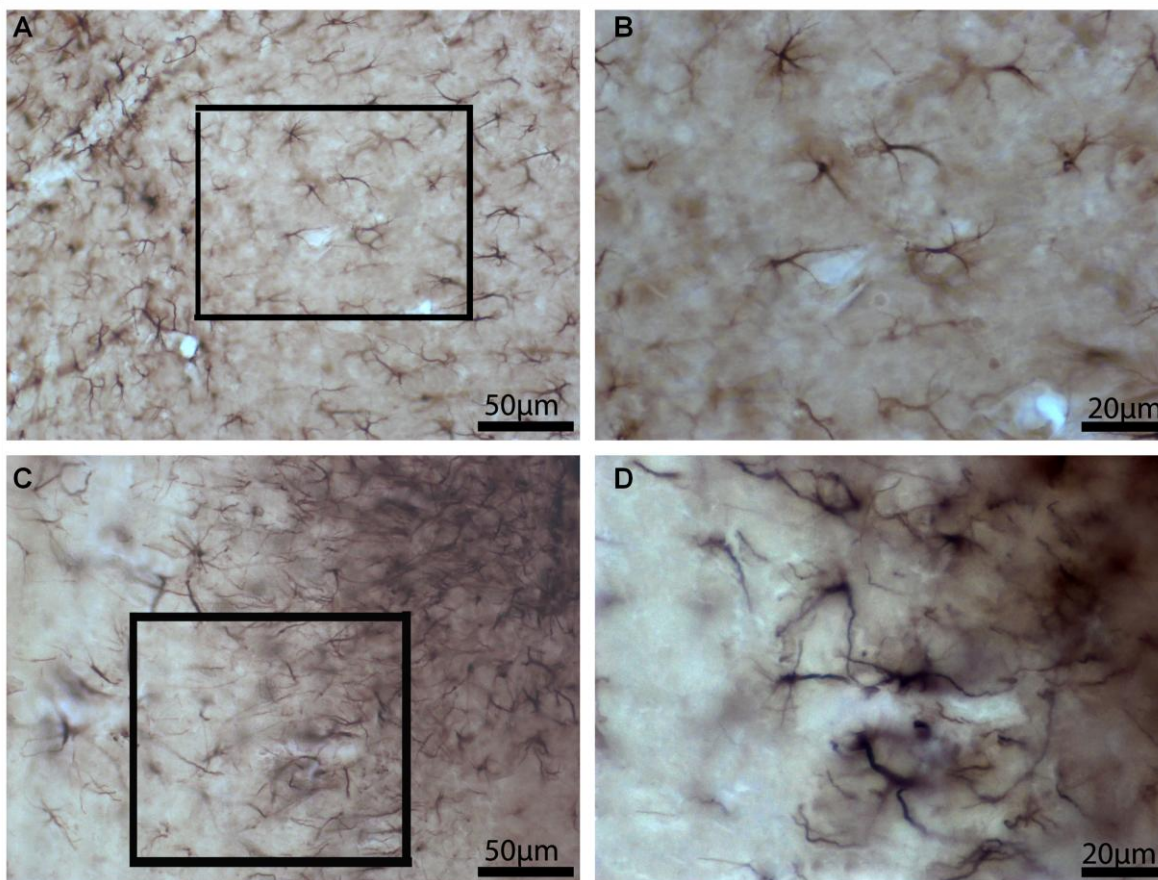


Figura 9: Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 3d.p.i. (C – D), processados por imunohistoquímica para marcação GFAP. **A** – região do cortex olfatóriol de animal controle 3 d.p.i.; **B** – mesma região de A em aumento maior, mostrando astrócitos sem reatividade; **C** – Evidente reação astrocitária no bulbo olfatório de animal infectado 3 d.p.i.; **D** – Maior aumento de C, mostrando astrogliose.

Secções de cérebro de animal controle 6 d.p.i. não apresentaram astrócitos reativos no parênquima(Figura 10A,B). Por outro lado, nos camundongos infectados com o vírus 6.d.p.i., mostraram a presença de astrogliose moderada principalmente no bulbo olfatório, cíngulum, cápsula interna, corpo estriado, tálamo, córtex frontal, regiões

paraventrículares do ventrículo lateral, 3° e 4° ventrículos e núcleo do trato solitário (Figura 10C,D,E,F).

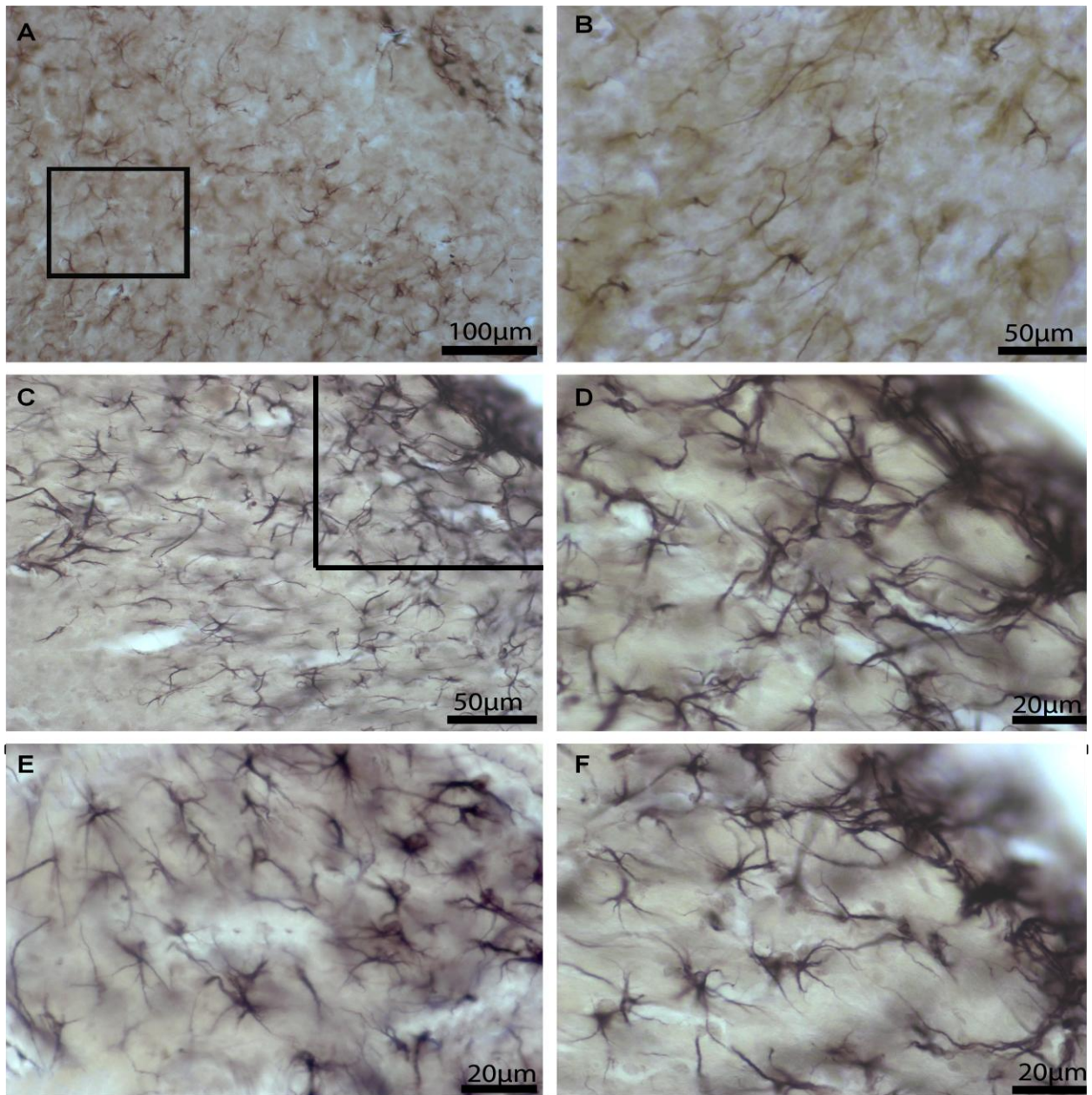


Figura 10: Micrografia de secções de cérebro de camundongo controle (A – B) e micrografia de secções de cérebro de camundongo infectado pelo vírus Marabá 6 d.p.i. (C, D, E, F) processados por imunohistoquímica para GFAP. **A** - Região do córtex frontal; **B** – maior aumento de A; **C** – região do córtex frontal com astrócitos reativos; **D** - maior aumento de C; **E** – região do núcleo do trato solitário abaixo do 4° ventrículo; **F** - Região do corpo estriado próximo ao ventrículo lateral revelando moderada astrogliose.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E DE NO

5.6.1 Técnica de ELISA tipo sandwich

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para análise da expressão da citocina pró-inflamatórias IL-12p40 e antiinflamatória TGF- β , foram realizados a partir de sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos infectados e de cérebros de animais normais, submetidos a eutanásia no terceiro ou sexto dia após a inoculação.

A análise da expressão das citocinas TGF- β não apresentou diferenças significativas entre os Ai e Ac nos tempos avaliados (dados não demonstrados). Isto também foi observado em relação a citocina IL-12p40, nas amostras provenientes de sobrenadantes de Ac e Ai com o vírus Marabá 3d.p.i. Por outro lado, os Ai 6 d.p.i. apresentaram aumento significativo na expressão de IL-12p40, quando comparados ao Ac do mesmo período e Ac e Ai de 3 d.p.i. (Figura 11).

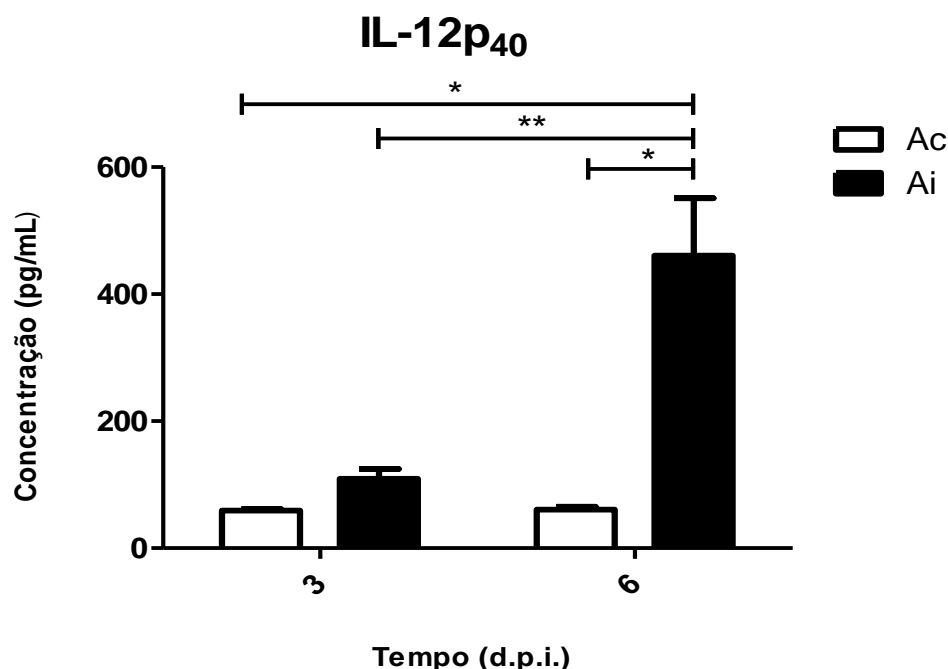


Figura 11: Análise estatística da expressão da citocina IL-12p40 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6.d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$.

5.6.2 Citometria de fluxo

O teste de Citometria de Fluxo para análise da expressão das citocinas IL-12p70, INF- γ , IL-6, TNF, IL-10 e quimiocina MCP-1 β , foi realizado a partir de sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos infectados e de cérebros de animais normais, eutanasiados no terceiro ou sexto dia após a inoculação.

A análise da expressão da citocina IL-p70 mostrou baixos níveis de expressão e, portanto, não apresentou diferenças significativas entre os Ai e Ac nos tempos avaliados - 3 e 6 d.p.i. (dados não demonstrados).

A expressão da citocina IL-10 3 d.p.i., não apresentou diferença entre os animais controles e infectados com o vírus Marabá. Por outro lado, os Ai 6 d.p.i. apresentaram aumento significativo na expressão de IL-10, quando comparados ao grupo controle do mesmo período de tempo, assim como para os outros grupos de animais 3 d.p.i. (Figura 12).

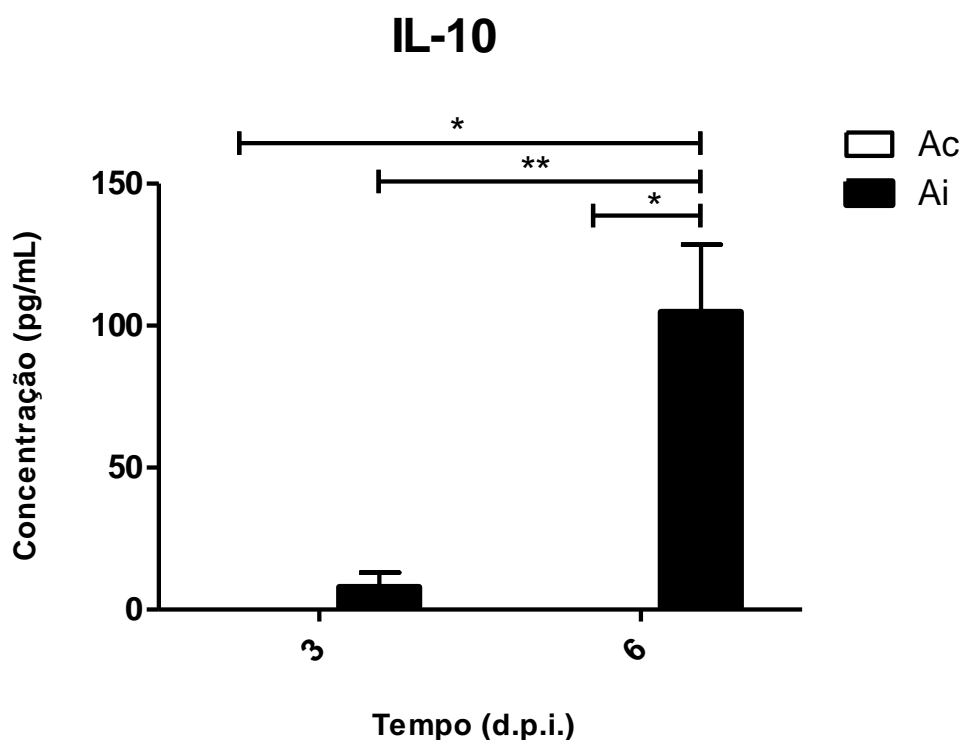


Figura 12 : Análise estatística da expressão da citocina IL-10 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6.d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$.

A análise da expressão da citocina TNF- α 3 d.p.i., não apresentou diferença significativa entre os animais controles e infectados com o vírus Marabá. No entanto, as amostras de Ai 6d.p.i apresentaram aumento significativo na expressão de TNF- α , quando comparados ao grupo controle do mesmo período de tempo, assim como para os outros grupos de 3 d.p.i (Figura 13).

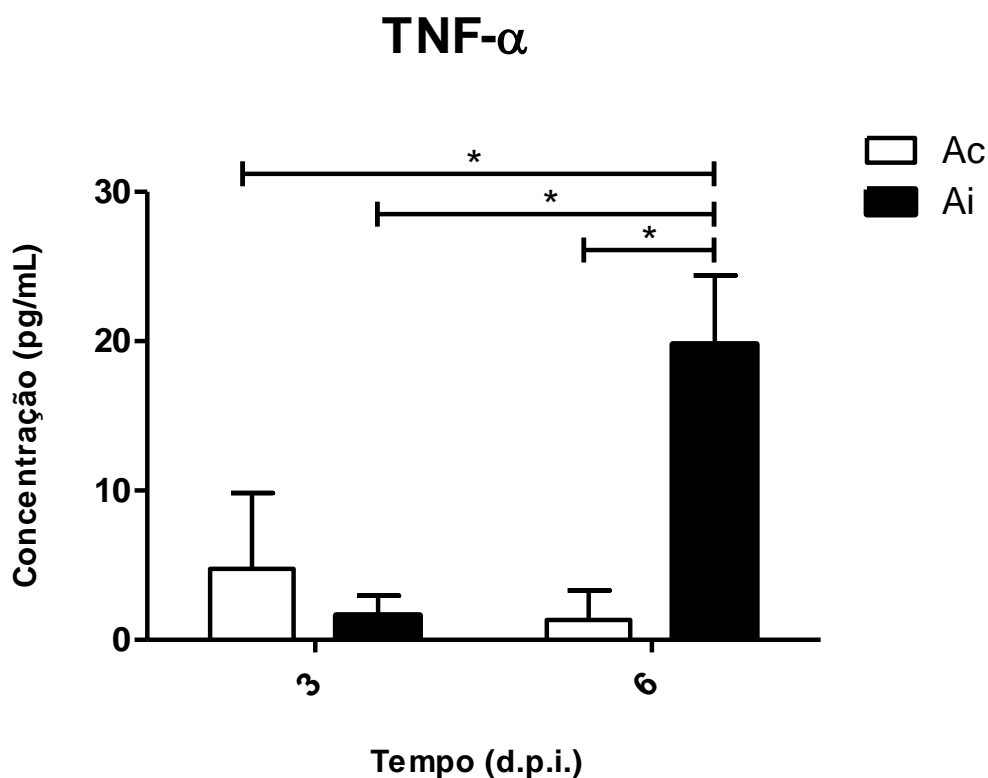


Figura 13 : Análise estatística da expressão da citocina TNF- α em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) de 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*)= p<0,05.

Os níveis de expressão da citocina IL-6 não apresentaram diferenças entre os animais controles e infectados com o vírus Marabá 3 d.p.i. Porém, os Ai 6 d.p.i. apresentaram aumento significativo na expressão de IL-6, quando comparados ao grupo controle do mesmo período de tempo, assim como para os outros grupos de 3 d.p.i (Figura14).

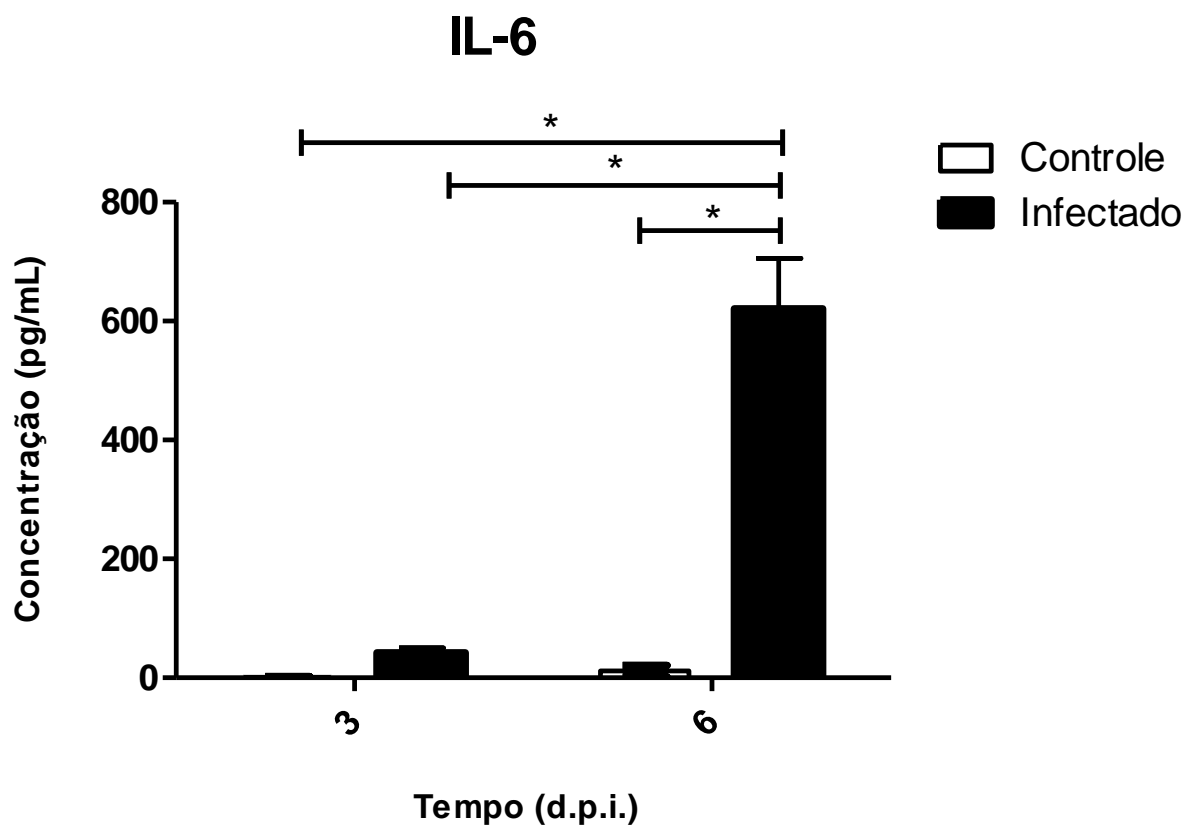


Figura 14 : Análise estatística da expressão da citocina IL-6 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) de 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6.d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) = $p < 0,001$.

As amostras para detecção de INF- γ também não apresentaram aumento da expressão desta citocina 3 d.p.i. nos grupos de animais controles e infectados pelos vírus Marabá. No entanto, os Ai 6 d.p.i. apresentaram aumento significativo na expressão de INF- γ , quando comparados ao grupo controle do mesmo período de tempo, assim como para os outros grupos de 3 d.p.i (Figura 15).

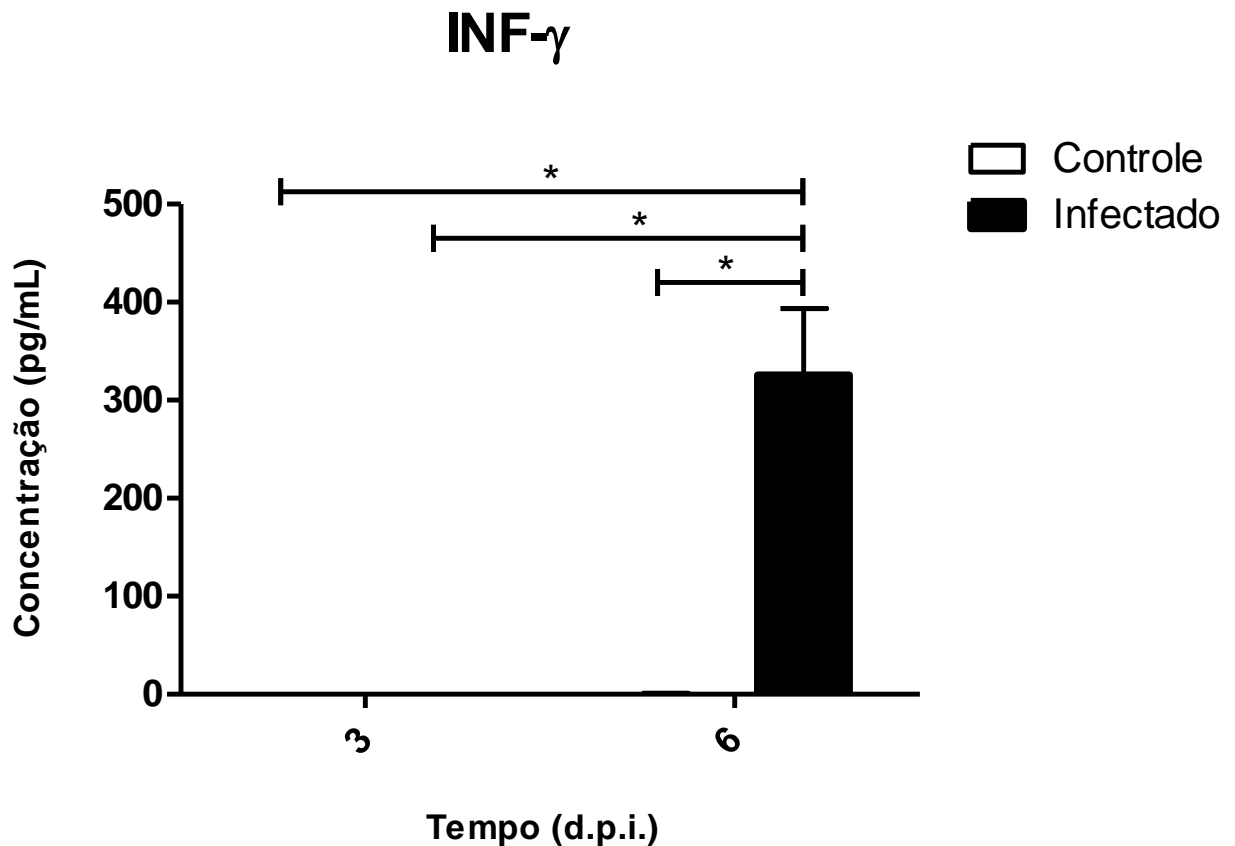


Figura 15 : Análise estatística da expressão da citocina INF- γ em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) e de 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6.d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) = $p < 0,001$.

As amostras para detecção de MCP-1 também não apresentaram aumento da expressão desta citocina 3 d.p.i. entre os grupos de animais controles e infectados pelos vírus Marabá. No entanto, os Ai 6 d.p.i. apresentaram aumento significativo na expressão de MCP-1, quando comparados ao grupo controle do mesmo período de tempo, assim como para os outros grupos de 3 d.p.i (Figura 16).

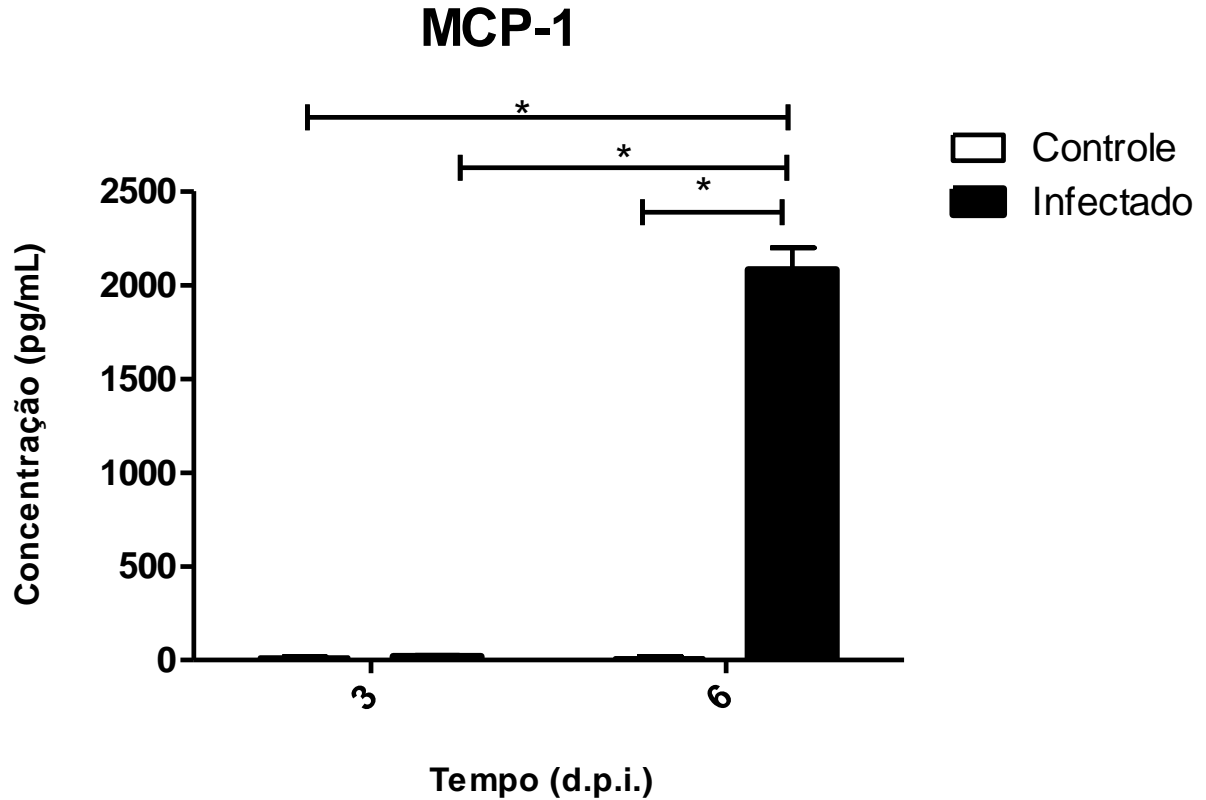


Figura 16 : Análise estatística da expressão da citocina MCP-1 em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) de 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6.d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) = $p < 0,001$.

5.6.3 Técnica do reagente de Griess para quantificação de nitrito

Este teste foi utilizado para quantificação de nitrito, formado pela oxidação espontânea de NO sob condições fisiológicas, a partir de sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos infectados e de cérebros de animais normais controles, sacrificados no terceiro e sexto dia após a inoculação. As amostras mostraram diferença significativa na expressão de NO entre os animais do grupo Ai sacrificados 6d.p.i quando comparado ao grupo de Ac do mesmo período de tempo (Figura 17).

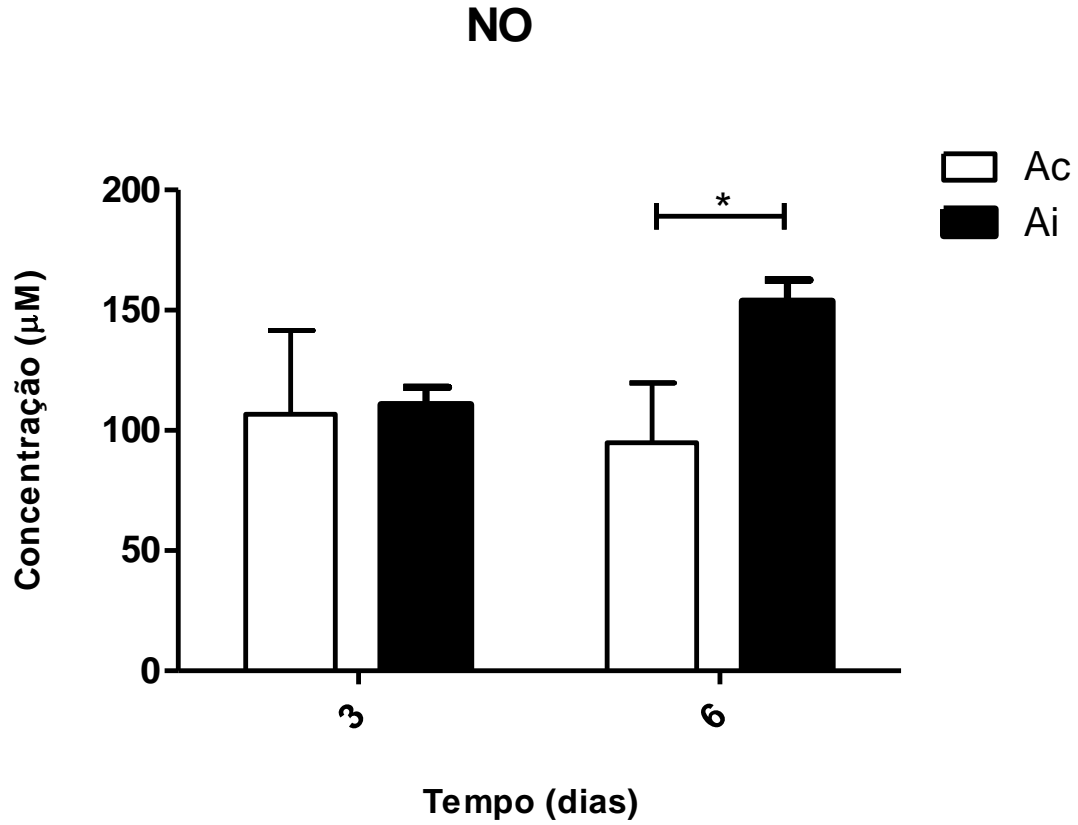


Figura 17: Análise estatística da expressão de Óxido Nítrico (NO) em sobrenadantes de homogeneizados de cérebros de camundongos previamente infectados com o vírus Marabá (Ai) e cérebros de animais normais (Ac) de 3 e 6 dias pós inoculação (d.p.i.). 3d.p.i. (3) e 6.d.p.i. (6). Ai: animal infectado; Ac: animal controle. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) = $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os estudos com o vírus Marabá tiveram início em 1983, quando o mesmo foi isolado a partir de fêmeas de flebotomíneos. Nessa época, foram realizados teste sorológicos que o caracterizaram como uma espécie do gênero VSV, membro da família *Rhabdoviridae*.

O presente trabalho é o primeiro a descrever as alterações anátomo-patológicas, a disseminação do antígeno viral no parênquima encefálico, a reação glial e o aumento da expressão de moduladores inflamatórios e NO, induzidos na infecção pelo vírus Marabá no SNC em camundongos adultos.

Para isso, foi realizada análise histopatológica, testes imunohistoquímicos em secções de encéfalo com o intuito de confirmar a presença do agente viral e analisar os estágios de ativação celular de micróglia e astrócitos a partir de sua morfologia. Além disso, foi realizada a quantificação da produção de citocinas e NO para traçar um perfil da resposta imune local induzida pelo vírus Marabá.

6.1 PATOGÊNESE

Dentre os patógenos que podem provocar encefalites, os vírus são os agentes patogênicos que mais causam doenças infecciosas no SNC, apresentando uma incidência global de 6,34 por 100 000 pessoas de todas as idades (FURR & MARRIOTT 2012; JMOR *et al.*, 2008). Ano após ano, vem sendo demonstrado a importância do estudo das encefalites causadas por vírus, tanto pela diversidade de espécies que acometem o SNC, como também pela variedade de lesões e pelas altas taxas morbimortalidade em humanos e em animais doméstico, de importância comercial e ecológica.

A co-evolução dos agentes virais com o sistema nervoso de mamíferos demonstra um duelo constante pela sobrevivência (CHAKRABORTY *et al.*, 2010). A maioria das infecções virais no SNC é transitória, mas algumas podem resultar em incapacidade ou morte. Diversos vírus de RNA e DNA entram no SNC por meio do transporte axonal do sistema nervoso periférico (SNP) (ABDELMAGID, 2012; DENIZOT *et al.*, 2012) e podem induzir injúria no tecido nervoso por replicação direta e lise das

células do hospedeiro, por ativação do sistema imune inato e adaptativo resultando em apoptose ou por indução de autofagia (ABDELMAGID, 2012; AMOR *et al*, 2010). Em outros casos, os vírus podem entrar no SNC por via hematogênica, devido às alterações nas células endoteliais dos vasos sanguíneos que permitem a passagem do vírus através da barreira hematoencefálica diretamente ou pelo interior das células infectadas que atravessam o endotélio (JOHNSON & CUNNINGHAM, 2011; DELEIDI & ISACSON, 2012).

Em nosso trabalho verificamos que os animais inoculados apresentaram sobrevida de 6 a 7 dias. Os resultados da análise histopatológica mostraram que apenas nos Ai 6 d.p.i foram observadas alterações anátomo-patológicas, distribuídas em várias regiões do encéfalo, com presença de picnose, necrose, edema, infiltrado inflamatório de células mononucleares na pia-máter e ao redor de vasos.

No estudo de Gomes-Leal e colaboradores (2006) a inoculação i.n. do vírus Marabá em camundongos neonatos mostrou que 25% dos animais inoculados morreram cerca de 20h após a inoculação. Esta morte prematura demonstra claramente a maior susceptibilidade dos camundongos neonatos quando comparados com a sobrevida dos adultos observada em nosso trabalho. Essa diferença na sobrevida destes animais é justificada pela imaturidade do sistema imune em animais recém nascidos.

O cerebelo, córtex cerebral, hipocampo e corpo estriado e a maioria dos neurônios corticais apresentaram alterações anátomo-patológicas, com presença de picnose e necrose induzidas pelo vírus Marabá em neonatos (GOMES-LEAL *et al.*, 2006).

Gomes-Leal e colaboradores (2006), também verificaram que na infecção induzida pelo VSV Piry, ocorreu intensa necrose em neurônios corticais e subcorticais. Neurônios do córtex cerebral, corpo estriado, hipocampo e cerebelo estavam claramente necróticos, sendo que células Picnóticas eram muito mais frequentes no córtex cerebral.

Por outro lado, com VSV Carajás os animais apresentaram sinais evidentes de infecção apenas dois dias após a inoculação, sendo que os mesmo começaram a morrer no terceiro dia após a inoculação. Os antígenos virais foram encontrados em

células redondas nas meninges, nos neurônios corticais, cerebelo, e nos vasos sanguíneos. A análise histopatológica revelou neurônios necróticos presentes principalmente em algumas regiões corticais, tais como córtex visual e parietal. Já o número de células picnóticas foi mais elevado no cerebelo (GOMES-LEAL *et al.*, 2006).

As alterações histopatológicas observadas em nosso trabalho são semelhantes as descritas por Gomes-Leal e Colaboradores (2006) em animais neonatos, variando contudo, o tempo de manifestação das mesmas devido à maior velocidade de disseminação do vírus nestes animais.

Nossos estudos mostraram que nos Ai 3 d.p.i o vírus Marabá estava presente somente nas células da superfície da pia-máter do bulbo olfatório, do córtex olfatório primário, córtex pré-límbico e infra-límbico. Enquanto que os Ai 6 d.p.i. o vírus alcançou diversas regiões encefálicas, incluindo a camada de células da pia-máter de várias regiões, o bulbo olfatório, regiões corticais (frontal, temporal, parietal, principalmente), camada de células endodimais dos ventrículos laterais, terceiro e quarto ventrículo, septo interventricular, corpo caloso, tálamo, corpo estriado, hipocampo (principalmente CA1 e CA3), giro denteado, mesencéfalo, ponte e bulbo do tronco encefálico e cerebelo.

Esses achados confirmam que as lesões encontradas nestas regiões estão relacionadas à presença do vírus, e sugere que a disseminação viral no parênquima encefálico pode ter ocorrido por transporte axonal, hematogênico e através do fluido cefalorraquidiano.

Alguns trabalhos mostraram que as primeiras células infectadas em uma inoculação de VSV via i.n. em camundongos Balb/c são os neurônios receptores do sistema olfatório (PLAKHOV *et al.*, 1995), em seguida os neurônios do bulbo olfatório são infectados, e, por conseguinte, o vírus é disseminado para outras áreas do cérebro (HUNEYCUTT *et al.*, 1994; FORGER *et al.*, 1991; LUNDH, *et al.*, 1987).

Na inoculação i.n. de um VSV, sorotipo New Jersey, em ratos, os antígenos virais foram inicialmente observados em neurônios do epitélio olfatório, seguido de uma disseminação caudal a partir do bulbo olfatório para outras regiões do cérebro. O vírus também foi detectado através do sistema ventricular e canal central da medula espinhal

(CORNISH, *et al.*, 2001). Esses achados assemelham-se com os resultados no que diz respeito as lesões e disseminação viral.

A sequencia de neuroinvasão para os vírus Curionópolis e Itacaiunas, espécies de um novo gênero proposto para a família *Rhabdoviridae* (DINIZ *et al.*, 2006), chamado *Bracorhabdovirus*, também parece ser muito similar àquela apresentada pelas espécies do gênero VSV, como a do vírus Marabá. Após infecção de camundongos neonatos por instilação nasal, antígenos dos vírus Curionópolis foram detectados em células das meninges e em alguns neurônios corticais, próximos à superfície da pia-máter. No segundo dia pós-inoculação, neurônios imunomarcados eram visíveis no bulbo olfatório, córtex pré-frontal ventral e meninges. Por outro lado, os antígenos virais do vírus Itacaiunas só foram detectados após 3 d.p.i., em alguns conjuntos de neurônios imunomarcados nas áreas frontais, córtex temporal e parietal, além de estarem visíveis próximos à superfície pial (DINIZ *et al.*, 2008), similar ao encontrado em nosso trabalho. Isso demonstra que apesar de serem espécies diferentes, apresentam semelhanças quanto ao avanço da infecção no SNC a partir de uma inoculação intranasal

6.2 RESPOSTA IMUNE NO SNC

As interações entre o sistema imunológico e SNC em mamíferos constituem uma complexa rede reguladora de ações celulares. A resposta imune no SNC diante de uma infecção em princípio deve ser um processo rápido, rigorosamente controlado que reduza de forma eficaz a disseminação do agente infeccioso, resultando em danos mínimos ao cérebro e prevenindo uma resposta auto-imune (CHAKRABORTY *et al.*, 2010). Astrócitos e micróglia respondem a qualquer dano no tecido nervoso, com ações complexas conhecidas como gliose reativa (STREIT, 2004). A reação glial *in vivo* produz uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, NO, e neuropeptídeos, os quais podem estar envolvidos tanto na neuroproteção, quanto na neurodegeneração (SAIJO *et al.*, 2013; SOLA *et al.*, 2002).

As células microgliais são os sensores de infecções virais no SNC e desempenham um papel fundamental na geração de resposta imune. Durante as fases

iniciais da infecção viral, essas células atuam como importantes mediadores de processos neuroinflamatórios e representam a primeira linha de defesa antes da infiltração de linfócitos no cérebro por meio da produção e secreção de inúmeros moduladores imunes (FURR; MARRIOTT 2012; MESTRE *et al.*, 2006; STELLA, 2009).

As microglias podem ser ativadas por muitos fatores, incluindo RNA de fita dupla e fita simples de origem viral, proteínas virais, membranas bacterianas e neurônios apoptóticos (TURRIN, 2008). Sua ativação é caracterizada por mudanças morfológicas, aumento da expressão de moléculas de superfície e da secreção de fatores pró-inflamatórios e/ou neurotóxicos (KAUR *et al.*, 2010), além disso pode induzir neuroproteção por liberar fatores tróficos e neuroprotetores tal como plasminogênio. Em contraste, pode induzir apoptose em neurônios infectados através da liberação de fatores tóxicos incluindo o NO (BENVENISTE, 1997;1998).

Chauhan e colaboradores (2010), verificaram que a infecção por VSV *in vivo* pode resultar na infecção das células da glia *in situ*, e que a replicação viral em astrócitos e microglias pode desempenhar um papel importante na produção de mediadores inflamatórios no SNC, o que pode possivelmente ser estendido para outros vírus neurotrópicos de RNA de cadeia negativa também.

Em modelo murino de encefalite induzida por VSV, tanto a astrocitose quanto a ativação microglial ocorrem já nas fases iniciais da doença (CHRISTIAN *et al.*, 1996, STEEL *et al.*, 2009). De Sousa e colaboradores (2011) relataram que camundongos albinos suíços adultos infectados com o VSV Piry apresentaram intensa ativação microglial ao longo da infecção, principalmente nas áreas do bulbo olfatório, septo interventricular e hipocampo.

Camundongos Balb/c jovens infectados por via i.c. com o vírus da raiva cepa CVS-11 apresentaram aumento no número de células microgliais com morfologia amebóide em 3 d.p.i., principalmente nas áreas do córtex e hipocampo (KOJIMA *et al.*, 2010).

Em nosso trabalho verificamos a ativação microglial já no 3º d.p.i., principalmente no bulbo olfatório, córtex pré-límbico, infra-límbico e meninges do córtex frontal. Por outro lado os Ai 6 d.p.i. demonstraram a intensa presença de micróglia ativadas em várias regiões do SNC, com marcação em células amebóides semelhantes às

microglias em último estágio de ativação, principalmente em regiões corticais, na pia-máter, hipocampo, septo interventricular e camadas paraventriculares dos ventrículos laterais e 3º e 4º ventrículos. Os resultados mostram algumas áreas, incluindo a região CA2 do hipocampo e pequenas porções giro denteado, sem a presença de microglia, e com evidente migração microglial em direção às regiões próximas à superfície pial.

Os locais onde foram observadas microglias ativadas coincidiram com os locais aqueles onde foi observada a presença de neurônios infectados com o vírus Marabá em ambos os tempos avaliados (3 e 6 d.p.i.), o que demonstra que a ativação microglial nas várias regiões do SNC ocorreu simultaneamente ao surgimento do vírus na região.

A reação astrocitária também é um importante mecanismo que pode corroborar para limitação das áreas de lesão (formação da cicatriz glial) e para o remodelamento e recuperação das funções neurais após injúrias (ROLLS *et al.*, 2009). A astrogliose reativa é caracterizada por aumento de GFAP, com hiperplasia e hipertrofia astrocítica, que ocorrem em resposta a todo tipo de insulto e doença no SNC (DA CUNHA *et al.* 1993; EDDLESTON & MUCKE 1993; SOFRONIEW, 2009).

Alguns estudos tem verificado que os astrócitos estão envolvidos na progressão patogênica da encefalite causada pelo vírus Herpes Simplex-1 (HSV-1) (REINERT, 2012). Durante a infecção por HSV-1, ocorre suprarregulação da liberação de citocinas por astrócitos infectados que podem alterar a comunicação normal entre neurônios - astrócitos e levar à instabilidade local do SNC (MACK, 2013).

Camundongos Balb/c adultos infectados via i.n. pelo VSV apresentaram astrogliose no bulbo olfatório 1 d.p.i., sendo que a ativação microglial somente foi observada 3 d.p.i. em regiões do bulbo olfatório (Bl *et al.*, 1995). Machado e colaboradores (2006) também observaram intensa marcação de astrócitos reativos no bulbo olfatório e hipocampo de camundongos C57Bl6 adultos, após 6 dias de infecção com o VSV.

Em nosso trabalho os Ai 3 d.p.i. apresentaram astrócitos reativos apenas no bulbo olfatório. Já os Ai 6 d.p.i. apresentaram astrogliose, principalmente no bulbo olfatório, córtex olfatório primário e regiões adjacentes às paredes ventriculares (corpo estriado, tálamo, septo interventricular e núcleo hipoglossal). A análise de nossos

resultados permitem dizer que a reação microglial foi mais intensa quando comparado à astrogliose em ambos os tempos avaliados (3 e 6 d.p.i.). Isto sugere que a resposta imunológica induzida pela infecção com o vírus Marabá está mais associada a ativação microglial do que a astrogliose.

Vários mediadores inflamatórios como citocinas/quimiocinas, são expressos constitutivamente por neurônios, astrócitos e microglias no SNC, em níveis basais (LUCAS *et al.*, 2006). Em condições patológicas, a produção desses mediadores aumenta, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune (KAUR *et al.*, 2010).

Microglias ativadas são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias no SNC, embora também possam expressar citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β , que inibem a própria resposta inflamatória através de um *feedback* negativo autócrino (KIM & NAGAI, 2010).

O TGF- β é uma citocina produzida por neurônios, astrócitos e microglias (LAW *et al.*, 2004; MAKWANA *et al.*, 2007). Esta citocina possui importantes características supressoras sobre alguns mecanismos de resposta imune, entre eles a diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , inibe a função de APCs e a atividade de iNOS, (MAKWANA *et al.*, 2007).

Alguns estudos demonstram que o TGF- β impede a neurodegeneração provocada por intensas respostas inflamatórias (HANISCH, 2002; MITCHELL *et al.*, 2013), e que sua expressão é rapidamente elevada em caso de injúrias no SNC (BRIONNE *et al.*, 2003; LAW *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado que o TGF- β inibe a ativação da microglia por sua habilidade em reduzir a expressão de moléculas MHC II, citocinas pró-inflamatórias e intermediários reativos de oxigênio (SUZUMURA *et al.*, 1993; MITCHELL *et al.*, 2013).

Em um estudo com encefalomielite alérgica, foi relatado que a expressão de TGF- β protege o hospedeiro contra danos provocados por esta doença, além disso, camundongos com deficiência no gene que codifica o TGF- β exibiram forte neuroinflamação por todo o cérebro, astrogliose excessiva e proliferação de microglia com fenótipo ativado (MAKWANA *et al.*, 2007).

No presente trabalho a expressão de TGF- β não apresentou aumento significativo nas amostras analisadas dos Ai em ambos os tempos avaliados (3° e 6°

d.p.i.). Fato este que pode ter corroborado com a intensa ativação microglial apresentada em nosso trabalho.

A IL-10 também é uma potente citocina antiinflamatória que pode inibir a ativação de macrófagos (DAVIDSON *et al.*, 2000) e a produção de IFN- γ por células Th1 (RANSOHOFF & BENVENISTE, 2006). Durante o curso de uma auto-imunidade no SNC, essa citocina pode ser produzida por macrófagos, células Th2, células B, células dendríticas, astrócitos e microglias (RANSOHOFF & BENVENISTE, 2006).

Cua e colaboradores (2001) em modelo de encefalomielite alérgica experimental, relataram que embora a IL-10 possa prevenir a inflamação do sistema nervoso, a localização e o momento da sua produção pode determinar sua efetividade. Os mesmos sugerem ainda que a IL-10 pode inibir a produção de IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α , sendo importante para a recuperação do hospedeiro. Outro trabalho verificou que a IL-10 é expressa no córtex cerebral de ratos estimulados com LPS, prevenindo a neurodegeneração (PARK *et al.*, 2007).

Nosso trabalho mostrou que apenas os Ai 6 d.p.i. apresentaram um aumento significativo na expressão da IL-10. Esses resultados coincidem com o período de maior ativação microglia, o que pode justificar o aumento de IL-10, uma vez que essas células expressam esta citocina como um mecanismo de *feedback* negativo autócrino na tentativa de diminuir o processo inflamatório, embora efetivamente não tenha contribuído para a diminuição da resposta inflamatória induzida pelo vírus.

A IL-12 pode ser produzida por astrócitos e microglias e infiltrados de células do sistema imune (KAUR *et al.*, 2010; LYNCH, 2009). É uma citocina pleiotrópica que induz vários mecanismos de perfil pró-inflamatório, entre eles a ativação de microglias, aumento da citotóxicidade e migração das células Natural Killer para a região da infecção, a produção de IFN- γ (TRINCHIERI *et al.*, 1992), de NO (KOMATSU *et al.*, 1999a), ativação dos linfócitos T CD8 (VALENZUELA, 2002) e diferenciação de outras células da imunidade específica (WOLF *et al.*, 1994).

A produção da IL-12p70 bioativa requer a expressão gênica das subunidades IL-12p35 and IL-12p40 (VIGNALI *et al.*, 2012). A ativação da transcrição gênica da IL-12p70 é dependente de 2 sinais: um iniciado por células CD40 e outro por IFN- γ (HAYES *et al.*, 1995; MOSCA, 2000). Ambos os sinais são necessários para a ativação

transcricional da subunidade IL-12p35, enquanto que a transcrição da IL-12p40 é menos dependente da indução por IFN- γ (CURTSINGER, *et al.*; 1999). Além disso, a expressão da IL-12p40 pode ser induzida em resposta ao patógeno somente nas células que podem expressar o heterodímero de IL-12p70 (GILLESSEN, 1995; VIGNALI, 2012; XU *et al.*, 2010).

A expressão da citocina IL-12 no SNC tem sido associada com a progressão de processos neurodegenerativos em algumas patologias, como a esclerose múltipla, encefalomielite alérgica experimental em ratos e camundongos e endotoxemia murina. (KAUR *et al.*, 2010; LYNCH, 2009)

Por outro lado, a infecção neurocentral por VSV parece contar com o controle da IL-12 que induz ativação de células, infiltração celular, indução de iNOS em neurônios, levando à redução do título do VSV (KOMATSU *et al.*, 1999a). Demonstrou-se que a IL-12 inibe a replicação de VSV através da indução de iNOS em neurônios *in vivo*, e camundongos *knockout* para iNOS foram mais suscetíveis a infecção letal e o tratamento com IL-12 não impediu esse fato (KOMATSU *et al.*, 1999b). Chesler & Reiss (2002), realizaram um estudo cujo tratamento com a IL-12 mostrou ser benéfico, tanto *in vitro* como *in vivo*, durante a infecção experimental com um VSV. A inibição da replicação do VSV era dependente da produção de NO induzido por esta citocina.

Em culturas de astrócitos infectados com o Coronavírus neurotrópico MHV- A59 e com o MHV-2 (não neurotrópico), os níveis das citocinas inflamatórias IL-12p40, TNF- α e IL-6 estavam mais altos nas culturas de astrócitos infectados com MHV-A59 do que em MHV-2, demonstrando que os astrócitos são importantes fontes desta citocina no SNC no combate a vírus neurotrópicos.(LI *et al.*, 2004).

Estudos anteriores relataram que as células que secretam IL- 12p70 bioativo também secretam IL-12p40 na forma livre em excesso quando comparado ao heterodímero IL-12p70 (TRINCHIERI, 1992; D'ANDREA, 1992; CASSATELLA, 1995). Ao que parece níveis constitutivamente elevados da expressão da IL-12p40 seria uma condição fundamental para a produção de IL-12p70 (RASHMI *et al.*, 2013). Esses relatos podem explicar nossos resultados, uma vez que obtivemos aumentos significativos dos níveis de expressão da subunidade IL-12p40 no grupo de Ai 6 d.p.i, o

que, todavia, não ocorreu com a expressão do heterodímero IL-12p70 em todos os grupos de animais no decorrer dos tempos avaliados.

Por outro lado, a subunidade IL-12p40 pode formar um homodímero, IL-12p80, que compete pelos receptores da IL-12 e antagoniza seus efeitos (HÖLSCHER, 2004).

O TNF- α é uma citocina que possui ação pró-inflamatória durante a fase aguda do processo inflamatório e imunossupressora na fase crônica da inflamação (HANISCH, 2002; LUCAS *et al.*, 2006). Esta citocina possui importantes modulações imunes em contextos neuropatológicos, como, por exemplo: a indução da ativação microglial (BENVENISTE, 1998); a proliferação de astrócitos e formação da cicatriz glial (SRIRAM *et al.*, 2006; WOICIECHOWSKY *et al.* 2004); estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção (RAHMAN & MCFADDEN, 2006); induz a expressão de outras citocinas, necrose e apoptose celular (RAHMAN & MCFADDEN, 2006; MIR *et al.*, 2008). Microglia e astrócitos ativados podem aumentar a expressão desta citocina no SNC (KIM & NAGAI, 2010; HUANG & HENRY, 2008).

O TNF- α está envolvido em processos neurodegenerativos, entre as razões está a capacidade de poder iniciar e manter por longo tempo a astrogliose (BUFFO *et al.* 2009). Outro fator importante é que esta citocina também pode induzir o aumento da expressão de IL-6, o que promove um aumento ainda maior na expressão de GFAP no córtex cerebral e no hipocampo (TANABE *et al.*, 2010; WOICIECHOWSKY *et al.*, 2004).

Em condições de infecção viral ocorre a expressão de TNF- α e a interação dele com o receptor do tipo I p55 pode induzir apoptose em células infectadas através da ativação de caspase 8 (MICHEAU & TSCHOPP, 2003). Em camundongos infectados pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) foi observado a indução do aumento nos níveis de TNF- α no soro pela IL-12 (MANETTI, 1993; HSIEH *et al.*, 1993).

Nosso estudo demonstrou aumento importante nos níveis de expressão de TNF- α nos Ai 6 d.p.i. O aumento da expressão desta citocina pode ser um produto da intensa gliose reativa observada no mesmo período de tempo (6 d.p.i), já que microglia e astrócitos são importantes fontes desta citocina no SN. Isso pode explicar também a presença de necrose e apoptose nos Ai 6 d.p.i.

A IL-6 é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras

células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente IL-1 e fator TNF- α (SOUZA, 2008).

A IL-6 é originalmente identificada como um factor que induz a maturação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos (HIRANO *et al.*, 1985), além disso, pode juntamente com outras citocinas, IFN- γ por exemplo, induzir gliose reativa, síntese local de fatores neurotróficos ou mesmo degeneração neural (CAMPBELL *et al.*, 1993). Resultados de infecções virais experimentais *in vitro* e *in vivo* indicam que uma das principais fontes de IL-6 no SNC são os astrócitos (LIEBERMAN *et al.*, 1989; YAMABE *et al.*, 1994; SCHNEIDER-SCHAULIES *et al.*, 1993).

Em nossos resultados os níveis de expressão de IL-6 nos Ai 6 d.p.i. mostraram aumentos significativos quando comparados aos outros grupos. O aumento a expressão de IL-6 nos Ai 6 d.p.i. pode ser produto do aumento dos níveis de TNF- α ou da gliose reativa nestes animais, uma vez que ambos os fatores contribuem para estimular o aumento da expressão da IL-6.

Outra citocina importante na modulação da resposta imune pró-inflamatória é o IFN- γ que pode exercer neuroproteção durante infecções virais (ROTTENBERG, 2002; WANG, 2003). Entretanto a expressão prolongada de IFN- γ no sistema nervoso central pode também produzir danos em neurônios e células e gliais (CORBIN, 1996; KIM, 2002)

O INF- γ é particularmente um potente ativador de microglia, que pode suprarregular a expressão de MHC-II, aumentar o processo fagocitário e a produção de citocinas por estas células (MERRILL, 1996; NGUYEN, *et al.*, 2012). Além disso, esta citocina pode indiretamente induzir o aumento dos níveis de expressão da enzima iNOS microglial, o que pode resultar em aumento na produção de óxido nítrico (MIR *et al.*, 2008).

A produção de INF- γ por astrócitos e microglias infectados por VSV induz a migração de células T para o SNC (TAUB *et al.*, 1993; VANGURI *et al.*, 1994). Em estudo com camundongos *Knockout* para receptores de INF- γ , confirmou o importante papel que esta citocina tem no desenvolvimento da resposta da imune contra a infecção intravenosa (MULLER, 1994), e intracerebral por VSV (BI *et al.*, 1995a; KUNDIG *et al.*, 1993). Em um estudo com um arbovírus Sindbis da família *Togaviridae*, demonstrou

que na ausência de anticorpos o INF- γ é essencial para a limpeza do vírus na fase aguda da infecção no SNC (BURDEINICK *et al.*, 2007). Isto normalmente ocorre após um aumento na produção da citocina IL-12, fator este importante na indução de aumento da expressão de IFN- γ (KOMATSU *et al.*, 1999a; OWENS *et al.*, 2006).

Nosso estudo mostrou aumento significativo na expressão de INF- γ ocorrido nos Ai 6 d.p.i., apesar do aumento dos níveis de IL-12p70, forma bioativa desta citocina, não terem sido significativos nos tempos avaliados.

A MCP-1 é uma quimiocina pró-inflamatória que promove efetiva infiltração de macrófagos em vários modelos de doenças inflamatórias (LU *et al.*, 1998; TESCH *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2001). Também exercem, *in vitro*, potente quimiotaxia para linfócitos T CD4 e CD8 ativados (CARR *et al.*, 1994). Essas respostas são mediadas pela exclusiva ligação da MCP-1 com o receptor CCR2 (BORING *et al.*, 1997; KURIHARA *et al.*, 1997). A MCP-1 está entre as moléculas constitutivamente expressas pelas microglias no SNC (KAUR *et al.*, 2010; KIM e NAGAI, 2010).

Em um modelo de encefalomielite experimental, A MCP - 1 é essencial para desencadear o recrutamento de macrófagos para os sítios de inflamação no SNC, além de serem necessários para a ativação das células Th *naive*. A ausência desta quimiocina leva a diminuição local do recrutamento de macrófagos e da resposta imune de linfócitos Th1 (HUANG *et al.*, 2001). **A MCP-1 tem importantes envolvimento não só no desenvolvimento da respota Th1 como também nos níveis de expressão de INF- γ por essas células (LU *et al.*, 1998). Por outro lado,** os níveis aumentados de MCP-1 tem importantes implicações na patogênese de varias doenças, e sua inibição pode trazer benefícios em tais condições (RUTLEDGE *et al.*, 1995; YADAV *et al.*, 2010).

Em nosso estudo a expressão de MCP-1 mostrou-se intensamente elevada nos Ai 6 d.p.i. Esta produção de MCP1 pode estar relacionado com presença de microglias ativadas e com o aumento de INF- γ . Além disso, o aumento da MCP-1 também pode estar associado a presença de infiltrados leococitários nas meninges e ao redor dos vasos observados nos ensaios histopatológicos e imonohistoquímicos dos Ai 6 d.p.i.

Outro mecanismo de defesa à invasão de agentes patogênicos no SNC é a produção de NO (SEGUIN *et al.*, 1994; STANGER *et al.*, 1994; HARRIS *et al.*, 1995).

Neurônios, astrócitos e microglias são células produtoras de NO (BREDT & SNYDER, 1994; CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; CORRADIN *et al.*, 1993) e a sua produção é induzida pela atividade de IL-12, IFN- γ ou TNF- α (BARNA *et al.*, 1996; KOMATSU *et al.*, 1997).

Os efeitos neuroprotetores do NO foram evidenciados, por exemplo, em infecções virais por VSV, ectromelia, vaccinia e herpes simples tipo 1 (BARNA *et al.*, 1996; BI *et al.*, 1995b; KARUPIAH *et al.* 1998; POPE *et al.* 1998).

Bi & Reiss (1995b), mostraram que entre os principais eventos da imunidade inata do SNC contra a infecção por VSV está na produção de NO pela microglia. Esse trabalho verificou que o aumento da expressão de iNOS microglial coincidiu com a diminuição da titulação do VSV. Por outro lado, o aumento da expressão de iNOS pode desencadear um aumento exagerado na produção de NO que, em determinadas condições, pode destruir neurônios (MANDER & BROWN, 2005).

Em nosso trabalho ocorreu aumento significativo na expressão de NO Ai 6 d.p.i., quando comparados aos Ac do mesmo tempo avaliado. Esses resultados coincidem com o aumento da expressão de IFN- γ , TNF- α , microglias ativadas, além da maior imunomarcagem do vírus em neurônios no mesmo grupo de animais, o que tomados em conjunto, podem estar colaborando com esse aumento de NO nos Ai 6 d.p.i.

O presente trabalho mostra alguns aspectos neuropatológicos induzidos pelo vírus Marabá em modelo murino adulto, bem como alguns eventos desencadeados pelo sistema imune durante a infecção. Nossos resultados demonstram que o vírus Marabá ao longo do tempo induz intensa resposta pró-inflamatória, caracterizadas pela ativação de micróglias, astrócitos, migração de células mononucleares, produção das citocinas IL-12p40, IFN- γ , TNF- α , IL-6, MCP-1 e de NO, que pode levar a óbito 100% dos animais infectados com este vírus, no período de 6 a 7 dias.

7 CONCLUSÃO

- Camundongos adultos infectados pelo vírus Marabá 3 d.p.i. apresentaram gliose reativa e a presença do vírus somente em regiões anteriores do cérebro adjacentes ao bulbo olfatório.
- Camundongos adultos com 6 d.p.i mostraram a presença do vírus Marabá por todo o encéfalo, principalmente no bulbo olfatório, córtex olfatório primário, córtex pré-límbico e infra-límbico, corpo estriado, tálamo, camada de células endoteliais dos ventrículos laterais, 3º e 4º ventrículos, hipocampo, giro denteado, regiões corticais, meninge pia-máter, cerebelo e mesencéfalo, ponte e bulbo do tronco encefálico;
- Camundongos adultos inoculados com o vírus Marabá apresentaram ao longo do tempo intensa gliose reativa, cuja localização ocorreu simultaneamente com a presença do vírus nas várias regiões do SNC.
- Os Ai com o vírus Marabá 6 d.p.i. apresentaram edema, necrose e picnose em várias regiões encefálicas.
- Animais infectados com o vírus Marabá apresentaram baixos níveis de TGF- β ao longo do tempo avaliados (3º e 6º d.p.i.), não interferindo, portanto, no processo inflamatório.
- Animais infectados com o vírus Marabá 6.d.p.i apresentaram aumentos significativos de IL-10, entretanto, parece não ter contribuído para a diminuição do processo inflamatório.
- A infecção pelos vírus Marabá *in vivo* induz uma resposta imune com intensa ativação microglial e moderada astrogliose, com predominância de perfil pró-inflamatório

promovido pelo aumento na produção das citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-6, MCP-1 e de NO nos tempos finais da infecção.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABDELMAGID, N. O. **Genetic regulation of neuroinflammation after infection and injury**. 2012. 52 f. Tese. Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet from Stockholm.

ACARÍN, L. et al. Microglial response to N-methyl-D- aspartate-mediated excitotoxicity in the immature rat brain. **J. Com. Neurol.** v. 367, p. 361-374, 1996.

AKIYAMA, H. et al. Early response of brain resident microglia to kainic acid-induced hippocampal lesions. **Brain Res.** v. 635, p. 257-268, 1994.

ALLIOT F, GODIN I, PESSAC B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. **Brain Res Dev Brain Res.** v.117, n. 2, p. 145-52.1999

AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER. D.; VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, p. 154-169, 2010.

AURÉLIE A. V. ALBERTINI, EDUARD BAQUERO, [...], and Yves Gaudin. Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry. **Viruses.** v.4, p.117-139, 2012

BABIC, N., METTENLEITER, T.C., UGOLINI, G., FLAMAND, A., COULON, P. "Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation." **Virology.** v. 204, p. 616-625, 1994.

BELOV G.A.; KOVTUNOVYCH G.; JACKSON C. L.; EHRENFELD E. Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. **Cell Microbiol.** v. 12, p. 1463-79, 2010.

BARNA, M.; KOMATSU, T.; REISS, C. S. Activation of type III nitric oxide synthase in astrocytes following a neurotropic viral infection. **Virology**, v. 223, n. 2, p. 331-43, 1996.

BARRON, K. D. et al. Perineuronal glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. **Brain Res.** v. 523, p. 219-229, 1990.

BENARROCH, E.E. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. **Mayo Clin. Proc.**, v. 80, p. 1326–1338, 2005.

BENVENISTE, E. N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **J. Mol. Med.** v. 75, p.165-173, 1997.

BENVENISTE, E. N. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 9, n. 3, p. 259-75, 1998.

BEZZI P, ET AL. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*. v.7, p. 702–710, 2001.

BIGNAMI, A. & DAHL, O. Gliosis. In: Kettenmman, H. & Ramson B. R. *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, p. 843-858, 1995.

BI, Z., P. QUANDT, T. KOMATSU, M. BARNA, AND C. S. REISS. IL-12 promotes enhanced recovery from vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system. *J. Immunol*.v. 155, n.12, 5684-9, 1995a.

BI, Z.; REISS, C. S. Inhibition of Vesicular Stomatitis Virus infection by nitric oxide. *J. Virology*, v. 69, p. 2208-2213, 1995b.

BLASKO I, STAMPFER-KOUNTCHEV M, ROBATSCHER P, VEERHUIS R, EIKELENBOOM P, GRUBECK-LOEBENSTEIN B. *Aging Cell*.v. 3, p. 169-76. 2004.

BLOOM D. C., GIORDANI N. V., KWIATKOWSKI D.L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta*. v.1799, n.3-4, p. 246-56, 2010.

BÓRAN, M. S.; BALTRONS, M. A.; GARCÍA, A. The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. *Glia*, v. 56, n. 4, p. 394- 411, 2008.

BORING, L., J. GOSLING, S. W. CHENSUE, S. L. KUNKEL, R. V. FARESE, JR, H. E. BROXMEYER, I. F. CHARO. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J. Clin. Invest. v.100, n. 10, p. 2552-61, 1997.

BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *J Neurosci*, v. 26, n. 18, p. 4930-4939, 2006.

BRAHIC, M.; BUREAU, J. F., MICHIELS, T. The genetics of the persistent infection and demyelinating disease caused by Theiler's virus. *Annu Rev Microbiol.*, v. 59, p. 279-298, 2005.

BRAHIC, M.; ROUSSARIE, J. P. Axon-Myelin Interactions during a Viral Infection of the Central Nervous System. *Plos pathogenes*, v. 5, n. 9, 2009.

BREDT, D. S., P. M. HUANG, AND S. H. SNYDER. Localization of nitricoxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. v. 347, p. 768–770, 1990.

BREDT, D. S.; S. H. SNYDER. Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* v. 63, p. 175–195, 1994.

BRIONNE TC, TESSEUR I, MASLIAH E, WYSS-CORAY T. Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron.* p.18, n.6, p.1133-45, 2003.

BRODAL, P. *The Central Nervous System.* 4th ed. Oxford: Oxford, 2010, p. 5-26. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=WdATFQ0YUrMC&oi=fnd&pg=PR7&dq=The+Central+Nervous+System.+Per+Brodal+&ots=TSuboiOAWV&sig=JfGwNX0iP0MZE9HXIbJDQtLtzP4#v=onepage&q=The%20Central%20Nervous%20System.%20Per%20Brodal&f=false>, Acesso em: 12 de Nov. 2013.

BUFFO A, ROLANDO C, CERUTI S. Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* v. 79, n. 2, p.77-89. 2009.

BURDEINICK-KERR R, WIND J, GRIFFIN DE. The synergistic roles of antibody and interferon in noncytolytic clearance of Sindbis virus from different regions of the central nervous system. *J Virol.* v. 81, p. 5628-5636, 2007.

CAMPBELL I. L., ABRAHAM C. R. , MASLIAH E., KEMPER P., INGLIS J. D., OLDSTONE M. B. A. , MUCKE L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral over- expression of interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 90, p. 10061 ± 10065, 1993.

CARR MW, ROTH SJ, LUTHER E, ROSE SS, SPRINGER TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* ; v. 91, n.9, p. 3652-6. 1994.

CARD, J. P., LEVITT, P., ENQUIST, L.W. "Different patterns of neuronal infection after intracerebral injection of two strains of pseudorabies virus." *J. Virol.* v. 72, p. 4434-44, 1998.

CARD, J. P., ENQUIST, L.W., MOORE, R.Y. "Neuroinvasiveness of pseudorabies virus injected intracerebrally is dependent on viral concentration and terminal field density." *J. Comp. Neurol.* v. 407, p.438-452, 1999.

CARDOSO, F.L., BRITES, D. & BRITO, M.A. Looking at the blood–brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* v. 64, p. 328–363, 2010.

CARMIGNOTO, G. & GOMEZ-GONZALO, M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res. Rev.*v. 63, p. 138–148, 2010.

CARPENTIER, P. A.; DUNCAN, D. S.; MILLER, S, D. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain, Behavior and Immunity*, p. 1-8, 2007.

CASSATELLA M. A., MEDA L., GASPERINI S., D'ANDREA A., MA X., TRINCHIERI G. (1995) *Immunol.* v. 25, p. 1–5, 1995.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, p. 417-423, 2002.

CIAVARRA R.P., A. STEPHENS , S. NAGY, M. SEKELICK, C. STEEL . Evaluation of immunological paradigms in a virus model: are dendritic cells critical for antiviral immunity and viral clearance. *J Immunol.*v. 177, p. 492–500, 2006.

CHAKRABORTY, S.; NAZMI, A.; DUTTA, K.; BASU, A. Neurons under viral attack: victims or warriors? *Neurochemistry International.*, v. 56, p. 727-735, 2010.

CHAUHAN V. S.; FURR S. R.; STERKA D. G. JR.; NELSON D. A.; MOERDYK-SCHAUWECKER M.; MARRIOTT I; GRDZELISHVILI V. Z. Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses. *Virology.* v. 10, n. 2, p.187-96, 2010.

CHESLER D. A.; REISS C. S. IL-12, while beneficial, is not essential for the host response to VSV encephalitis. *J Neuroimmunol.* v.131, p.92-7, 2002.

CORBIN J. G.; KELLY D.; RATH E.M.; BAERWALD K.D.; SUZUKI K. Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. *Mol Cell Neurosci.* v. 7, p. 354-370, 1996.

CORRADIN, S. B., J. MAUEL, S. D. DONINI, E. QUATTROCCI, AND P. RICCIARDI CASTAGNOLI. Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells. *Glia.* v. 7, p. 255–262, 1993.

CORNISH T. E., STALLKNECHT D. E., BROWN C. C., SEAL B. S., AND HOWERTH E. W. Pathogenesis of Experimental Vesicular Stomatitis Virus (New Jersey Serotype) Infection in the Deer Mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Vet Pathol .* v. 38, p.396–406, 2001.

CONSTANTINUESCU C.; FREI K.; MALIPIERO U.; ROSTAMI A.; FONTANA A. Astrocytes and microglia produce IL-12. *Ann N York Acad Sci.* v. 795, p. 328–333, 1996.

CHRISTIAN, A. Y., BARNA, M., BI, Z. AND REISS, C. S. Host immune response to vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system in C57BL/6 mice. *Viral Immunol.* v. 9, p. 195-205. 1996.

CROTTY, S., HIX, L., SIGAL, L.J., ANDINO, R. "Poliovirus pathogenesis in a new poliovirus receptor transgenic mouse model: age-dependent paralysis and a mucosal route of infection." J. Gen. Virol. v. 83, p. 1707-1720, 2002.

CURTSINGER J.M., *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. J Immunol. v. 162(6), p. 3256–3262, 1999.

DA CUNHA A.; JEFFERSON J.J.; TYOR W. R.; GLASS J. D.; JANNOTTA F. S.; VITKOVIC L. Gliosis in human brain: relationship to size but not other properties of astrocytes. Brain Res. v. 8; n.1, p. 161-5. 1993.

DALAKAS, M. C. Pathogenetic mechanisms of post-polio syndrome: morphological, electrophysiological, virological, and immunological correlations. Ann N Y Acad Sci. v. 753, p. 167–85, 1995.

D'ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N. M.; CHEHIMI, J.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHAN, S. H.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; NICKBARG, E. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. J. Exp. Med. v. 176, p. 1387–1398. 1992.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. Ann N Y Acad Sci. v. 933, p. 222–234, 2001.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L.; GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci. v. 8, p. 752–8, 2005.

DAVIDSON, N.J.; FORT, M. M.; MULLER, W.; LEACH, M.W.; RENNICK, M.; Chronic colitis in IL-10 mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. Int. Rev. Immunol. v. 19, p. 91–121, 2000

DELEIDI, M.; ISACSON, O. Viral and Inflammatory Triggers of Neurodegenerative Diseases. Neurology, v. 4, n. 121, p. 121ps3, 2012.

DE SOUSA, A. A.; REIS, R.; BENTO-TORRES, J.; TRÉVIA, N.; LINS, N. A.; PASSOS, A.; SANTOS, Z.; DINIZ, J. A.; VASCONCELOS, P. F.; CUNNINGHAM, C.; PERRY, V. H.; DINIZ, C. W. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. Plos one, v. 6, n. 1, 2011.

DENIZOT, M.; NEAL, J. W.; ET al. Encephalitis due to emerging viruses: CNS innate immunity and potential therapeutic targets. The Journal of infection, v. 95, n. 16, p. 9524-9529, 2012.

DINIZ, J. A. P.; NUNES, M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; CRUZ, A. C.; DE SOUZA, W.; MEDEIROS, D. B.; CHIANG, J. O.; VASCONCELOS, P. F.

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

DINIZ, J. A. P.; SANTOS, Z. A.; BRAGA, M. A. G.; DIAS, A. L. B.; SILVA, D. E. A.; MEDEIROS, D. B. A.; BARROS, V. L. R. S.; CHIANG, J. O.; ZOGHBI, K. E. F.; QUARESMA, J. A. S.; TAKIYA, C. M.; NETO, V. M.; SOUZA, W.; VASCONCELOS, P. F. C.; DINIZ, C. W. P. Early and Late Pathogenic Events of Newborn mice Encephalitis Experimentally Induced by Itacaiunas Curionopolis Bracorhabdoviruses Infection. *Plos One*, v. 3, n. 3, p. 1-12, 2008.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. Pathology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* v.22, p.391-397, 1999.

DIRNAGL, U.; PRILLER, J. Focal cerebral ischemia: the multifaceted role of glial cells. In: *Neuroglia*. KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. Oxford University Press. 2nd ed. New York. p. 511-520, 2005.

DOBLER, G. "Arboviruses causing neurological disorders in the central nervous system." *Arch. Virol. Suppl.* v. 11, p. 33-40, 1996.

EDDLESTON, M.; MUCKE L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*. v. 54, n.1, p. 15-36. 1993.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.*, v. 28, n. 3, p. 138-145, 2007.

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

FORGER, J. M.; BRONSON, R. T.; HUANG, A. S.; REISS, C. S. "Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2d system." *J Virol.* v. 65, n. 9, p. 4950-8, 1991.

FURR, S. R.; MARRIOTT, I. Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. *Front. Microbio.*, v. 3, p. 201, 2012.

GALEA, E.; REIS, D. J.; FEINSTEIN, D. C. Cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* v. 37, p. 406– 414, 1994.

GALOU, M. *et al.* The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene Knockout studies. *Biology of the cell.* v. 89, p. 85-97, 1997.

GARDEN, G. A. ; MÖLLER, T. Microglia biology in health and disease. J Neuroimmune Pharmacol. v. 1, n. 2, p. 127-37, 2006.

GILDEN, D. H., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; LAGUARDIA, J.J.; MAHALINGAM, R.; COHRS, R.J. Neurologic complications of the reactivation of varicella-zoster virus. N Engl J Med. v. 342, p. 635-45. 2000.

GILLESSEN, S.; CARVAJAL, D.; LING, P.; PODLASKI, F. J.; STREMLO, D. L.; FAMILLETTI, P. C.; GUBLER, U.; PRESKY, D. H.; STERN, A. S.; AND GATELY, M. K. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer. A potent IL-12 antagonist. Eur. J. Immunol. v. 25, p. 200–206. 1995.

GINHOUX, F., GRETER, M.; LEBOEUF, M.; NANDI, S.; SEE, P.; GOKHAN, S.; MEHLER, M.F.; CONWAY S. J.; STANLEY E. R.; SAMOKHVALOV I. M.; MERAD, M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science. v. 5, p. 841-5, 2010.

GODBOUT, J. P.; JOHNSON, R. W. Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences. Immunol Allergy Clin North Am. v. 29. p 321–337, 2009.

GOMES, F. C. A. *et al.* Neurons induce GFAP promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. Glia, v. 26, p. 97-108, 1999.

GOMES-LEAL, W.; MARTINS, L.C.; DINIZ, J.A.; DOS SANTOS, Z.A.; BORGES, J.A.; MACEDO, C.A.; MEDEIROS, A.C.; DE PAULA, L.S.; GUIMARÃES, J.S.; FREIRE, M.A.; VASCONCELOS, P.F.; PICANÇO-DINIZ, C.W. "Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice" Acta Tropica v. 97, p. 126–139. 2006.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 32, n. 4, p. 619-631, 1999.

GORDON, G.R.; MULLIGAN, S.J. & MACVICAR, B.A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. Glia. v. 55, p. 1214–1221, 2007.

GRAEBER, M. B. *et al.* Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. Neurosci. Lett., v. 85, p. 317-321, 1988.

GRAEBER, M. B. & STREIT, W. J. Microglia: immune network in the CNS. Brain Pathol., v.1, p. 2-5, 1990.

GUBLER, U.; CHUA, A. O.; SCHOENHAUT, D. S.; DWYER, C. M.; MCCOMAS, W.; MOTYKA, R.; NABAVI, N.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; FAMILLETTI, P. C.

Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 88, p. 4143–4147. 1991.

HAGA, S.; AKAI, K.; ISHII, T. Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. *Acta Neuropathol.*, v.77, p. 569-575, 1989.

HANISCH U. K. , KETTENMANN H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* v. 10, p. 1387–1394, 2007.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, v. 40, n. 2, p. 140-55, 2002.

HARRIS, N. et al. Gamma interferon-induced nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J. Virol.* v. 69, p. 910-915, 1995.

HASHIOKA, S., KLEGERIS, A., SCHWAB, C., YU, S. & MCGEER, P.L. Differential expression of interferon- γ receptor on human glial cells in vivo and in vitro. *J. Neuroimmunol.* v. 225, p. 91–99, 2010.

HAYES MP, WANG J, NORCROSS MA. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon- γ of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood.* 1995; v. 86(2): p. 646–650, 1995.

HENEKA, M. T.; RODRÍGUEZ, J. J.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*, v. 63, p. 189 – 211, 2010.

HENNESSY M.B.; DEAK T.; SCHIML P.A. Sociality and sickness: Have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure. *Brain Behav Immun.* v. 13, p. 520, .2013.

HENRY C.J.; HUANG Y.; WYNNE A.M.; GODBOUT J.P. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, Behav Immun*, v. 23, p. 309– 317, 2009.

HIRANO, T.; TAGA, T.; NAKANO, N.; YASUKAWA, K.; KASHIWAMURA, S.; SHIMIZU, K. *et al.* Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 82, p. 5490-4, 1985.

HÖLSCHER, C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. ***Med Microbiol Immunol.*** v. 193, n.1, p. 1-17, 2004.

HSIEH, C. S. et al. Development of Th1 CD4 T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. ***Science.*** v. 260, p. 547, 1993.

HUANG, D.; WANGA, J.; KIVISAKKA, P., ROLLINSB, B.J.; RANSOHOFFA, R.M. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Mice Leads to Decreased Local Macrophage Recruitment and Antigen-specific T Helper Cell Type 1 Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **JEM**. v. 193 p. 713-726, 2001.

HUANG Y.; HENRY, C. J. *et al.* Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol Aging**, v. 29, p. 1744–53, 2008.

HUNEYCUTT, B. S.; BI, Z.; AOKI, C. J.; REISS, C. S. Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. **J Virol**, v. 67, n. 11, p. 6698-706, 1993.

HUNEYCUTT, B. S.; PLAKHOV, I.V.; SHUSTERMAN, Z.; BARTIDO, S.M.; HUANG, A., REISS, C.S.; AOKI, C. "Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis." **Brain Res**. v. 635, p. 81-95. 1994.

HUNSPERGER, E. A. & ROEHRUG, J. T. " Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice." **J. Neurovirol**. v. 12, p. 129-139. 2006.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Disponível em: www.ictvdb.org

IMAI, Y.; IBATA, I.; ITO, D.; OHSAWA K.; KOHSAKA S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochem Biophys Res Commun**.v. 224, p. 855–862, 1996.

IRELAND, D. D.; REISS, C. S. Expression of IL-12 receptor by neurons. **Viral Immunol**. v. 17, p. 411–22, 2004.

ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K.; NAKAJIMA, K.; FUKUUCHI, Y.; KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. **Brain Res**. v. 57, p. 1–9, 1998.

ITO, D.; TANAKA, K.; SUZUKI, S.; DEMBO, T.; FUKUUCHI, Y. Enhanced expression of *Iba1*, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke**. v. 32, p. 1208–1215, 2001.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev**. v. 59, n. 4, p. 533-47, 1995.

JMOR, F., EMSLEY, H. C., FISCHER, M., SOLOMON, T., LEWTHWAITE, P. The incidence of acute encephalitis syndrome in Western industrialised and tropical countries. **Viol. J.**, v. 30, p. 2008.

JOHNSON, N.; CUNNINGHAM. The inflammatory response to viral infection on the central nervous system. In: HAYASAKA, D. Pathogenesis of Encephalitis. 1st ed. Croácia: InTech, 2011, cap. 7, p. 95-116.

JULKUNEM, I.; MELÉN, K.; NYQVIST, M.; PIRHONEN, J.; SARENEVA, T.; MATIKAINEN, S. "Inflammatory responses in influenza A vírus infection." **Vaccine**. v. 19, v. 32-7, 2000.

KARABATSOS, N. **Catalogue of Arthropod-Borne viruses of the World**. San Antonio, TX: Am. Soc. Trop. Med. Hyg. ,Ed.1985

KARUPIAH, G. *et al.* Inhibition of viral replication by interferon- γ induced nitric oxide synthase. **Science**. v. 261, p. 1445-1448,1993.

KARUPIAH, G.; CHEN, J. H.; MAHALINGAM, S.; NATHAN, C. F.; MACMICKING, J. D. Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. **J Exp Med**, v. 188, n. 8, p. 1541-1546, 1998.

KAUR, G.; HAN, S. J.; YANG, I.;CRANE, C. Microglia and central nervous system immunity. **Neurosurg Clin N Am**, v. 21, n. 1, p. 43-51, 2010.

KIM, S. U.; NAGAI, A. Microglia as immune effectors of the central nervous system: Expression of cytokines and chemokines. **Clin Exp Neuroimmunol**, v. 1, p. 61-69, 2010.

KIM, I. J.; BECK, H. N.; LEIN, P. J.; HIGGINS D. Interferon gamma induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation. **J Neurosci**. v. 22, p. 4530-4539, 2002.

KIMELBERG, H. K. & NOREMBERG, M. D. Astrocytes. **Scientific American**, v. 260, n. 4, p. 66-76, 1989.

KLEGERIS, A.; MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. **Curr Opin Neurol.**, v. 20, p. 51-357, 2007.

KOBAYASHI, M., L. FITZ, M. RYAN, R. HEWICK, S. CLARK, S. CHAN, R. LOUDON, F. SHERMAN, B. PERUSSIA, G. TRINCHIERI. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.** v. 170, p. 827-845. 1989.

KOJIMA, D.; PARK, C. H.; TSUJIKAWA, S.; KOHARA, K.; HATAI, H.; OYAMADA, T.; NOGUCHI A; INOUE, S. Lesions of the central nervous system induced by intracerebral

inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). **J Vet Med Sci.** v.2, n. 8, p.1011-6, 2010.

KOMATSU, T.; BARNA, M.; REISS, C. S. Interleukin-12 promotes recovery from viral encephalitis. **Viral Immunol**, v. 10, n. 1, p. 35-47, 1997.

KOMATSU, T.; SRIVASTAVA, N.; REVZIN, M.; IRELAND, D. D.; CHESLER, D.; REISS, C. S. Mechanisms of cytokine-mediated inhibition of viral replication. **Virology**, v. 259, n. 2, p. 334-41, 1999a.

KOMATSU, T.; IRELAND, D. D.; CHEN, N.; REISS, C. S. Neuronal expression of NOS-1 is required for host recovery from viral encephalitis. **Virology**, v. 258, n. 2, p. 389-395, 1999b.

KUBIN, M, J. M.; CHOW, G. Trinchieri. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. **Blood.** v. 83, p. 1847–55, 1994.

KUNDIG, T. M.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. T cell-dependent IFN-g exerts an antiviral effect in the central nervous system but not in peripheral solid organs. **J. Immunol.** v. 150, p. 2316–2321, 1993.

KUO, P. C., SCHROEDER, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann Surg.** v. 22, p.220-35.1995.

KURIHARA, T.; WARR, G.; LOY, J.; BRAVO, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. J. Exp. Med. v. 186, n. 10, p. 1757-62.1997.

LANE, J. H; SASSEVILLE, V. G.; SMITH, M. O.; VOGEL, P.; PAULEY, D. R.; HEYES, M. P.; LACKNER, A. A."Neuroinvasion by simian immunodeficiency virus coincides with increased numbers of perivascular macrophages/microglia and intrathecal immune activation." **J. Neurovirol.** v. 2, p. 423-432, 1996.

LAW, K.; WEIDEN, M.; HARKIN, T.; TCHOU-WONG, K.; CHI, C.; ROM, W.N. "Increased release of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis," **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, vol. 153, no. 2, p. 799– 804, 1996.

LAW, A.K.; GUPTA, D.; LEVY, S.; WALLACE, D. C.; MCKEON, R. J.; BUCK, C. R. TGF- β 1 induction of the adenine nucleotide translocator 1 in astrocytes occurs through Smads and Sp1 transcription factors. **BMC Neurosci.** v. 13, n. 5, 2004.

LEE, G. et al. Drug transporters in the central nervous system: Brain barriers and brain parenchyma considerations. **Farmacol Rev.**, v. 53, p. 569-596, 2001.

LEE, E.; WRIGHT, P.J.; DAVIDSON, A.; LOBIGS, M. Virulence attenuation of Dengue virus due to augmented glycosaminoglycan-binding affinity and restriction in extraneural dissemination. **J Gen Virol**. v. 87, p 2791–2801. 2006.

LEE-HALL, L.; BORKE, R.C.; ANDERS, J. J. Transection or electrical stimulation of the hypoglossal nerve increase glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the hypoglossal nucleus. **Brain Res**. v. 490, p.157-161, 1989.

LI, Y.; FU, L.; GONZALES, D. M.; LAVI, E. Coronavirus neurovirulence correlates with the ability of the virus to induce proinflammatory cytokine signals from astrocytes and microglia. **J Virol**, v. 78, n. 7, p. 3398–3406. 2004.

LIEBERMAN, A. P.; PITHA, P. M.; SHIN, H. S.; SHIN, M. L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 86, p. 6348 – 6352, 1989.

LING,P.; GATELY, M.K.; GUBLER, U.; STERN,A.S.; LIN, P.; HOLLFELDER,K.; SU,C.; PAN, Y. C.; AND HAKIMI, J. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. **J. Immunol**. v. 154, p. 116–127. 1995.

LIU, J, *et al*. Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1-associated neurodegeneration. **J Immunol**. v. 182, p. 3855–3865. 2009.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; ANDLENARDO, M. J.; The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**. v. 104, p.487–501.2001.

LU, B.; RUTLEDGE, B.J.; GU, L.; FIORILLO, J.; LUKACS, N.W.; KUNKEL, S.L.; NORTH, R.; GERARD, C.; AND ROLLINS. B.J.; Ab-normalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1–deficient mice. **J.Exp. Med**. v. 187, p. 601–608, 1998.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**, v. 147, p. 232-240, 2006.

LUNDH, B.; KRISTENSSON, K.; AND NORRBY, E.; Selective infection of olfactory and respiratory epithelium by vesicular stomatitis and Sendai viruses. **Neuropathol. Appl. Neurobiol**. v. 13, p. 111–122.1987.

LUNDH, B.; LOVE, A.; KRISTENSSON, K.; NORRBY, E. Non-lethal infection of aminergic reticular core neurons: age-dependent spread of ts mutant vesicular stomatitis virus from the nose. **J Neuropathol Exp Neurol**. v. 47, p. 497–506, 1988

LUNDH, B. : Spread of vesicular stomatitis virus along the visual pathways after retinal infection in the mouse. **Acta Neuropathol**. v. 79, p. 395–401, 1990.

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

MACATONIA, S. E., HOSKEN, N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. **J Immunol**. v. 154, p. 5071–9. 1995.

MACK, A. F.; WOLBURG, H. A. novel look at astrocytes: aquaporins, ionic homeostasis, and the role of the microenvironment for regeneration in the CNS. **Neuroscientist**. v.19: p.195–207, 2013.

MAGISTRETTI, P.J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **J. Exp. Biol**. v. 209, p. 2304–2311, 2006.

MAKWANA, M.; JONES, L. L.; CUTHILL, D.; HEUER, H.; BOHATSCHEK, M.; HRISTOVA, M.; FRIEDRICHSEN, S.; ORMSBY, I.; BUERINGER, D.; KOPPIUS, A.; BAUER, K.; DOETSCHMAN, T.; RAIVICH, G. Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. **J Neurosci**. v. 17, n. 27, p. 11201-13, 2007.

MANDER, P.; BROWN, G. C. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. **J Neuroinflammation**, v. 2, p. 20, 2005.

MANETTI, R. Natural killer stimulatory factor (interleukin-12) induces T helper type-1(Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing cells. **Exp. Med**. v.177, p.1199, 1993.

MAO, N.; ZHAO, L.; ZHU, Z.; CHEN, X.; ZHOU, S.; ZHANG, Y.; CUI, A.; JI, Y.; XU, S.; XU, W. An aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 6 in Anhui province, China. **J Med Virol**. v. 82, n. 3, p. 441-5. 2010.

MARTIN, D. A. *et al*. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 5, p.1823-1826, 2000.

MAX, Y. E. W.; MEI, Z. Change of cholinergic transmission and memory deficiency induced by injection of beta-amyloid protein into NBM of rats. **Sci China C Life Sci**. v. 44, n. 4, p. 435-42, 2001.

MCCANDLESS, E.E.; ZHANG B.; DIAMOND, M.S.; KLEIN, R.S. CXCR4 antagonism increases T cell trafficking in the central nervous system and improves survival from West Nile virus encephalitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 105, p. 11270–11275, 2008.

MESSAM, C.A.; HOU, J.; MAJOR, E. Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CSC defined by a human-specific anti-nestin antibody. **Exp. Neurol.**, v.161, p. 585-596, 2000.

MERRILL, J.E., BENVENISTE, E.N. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful, **Trends Neurosci.** v. 19, p. 331–338, 1996.

MESTRE, L.; CORREA, F.; DOCAGNE, F.; CLEMENTE, D.; GUAZA, C. The synthetic cannabinoid Win 55-212, 2 increases COX-2 expression and PGE2 release in murine brain derived endothelial cells following Theiler's virus infection. **Biochem. Farmacol.**, v. 72, p. 869-880, 2006.

MICHEAU, O; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell.** v. 114, v. 181–190, 2003.

MIR, M.; TOLOSA, L.; ASENSIO, V. J.; LLADÓ, J.; OLMOS, G. Complementary roles of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in inducible microglial nitric oxide generation. **J Neuroimmunol**, v. 204, n.1-2, p. 101-109, 2008.

MITCHELL, K.; SHAH, J. P.; TSYTSIKOVA, L. V.; CAMPBELL, A. M. ; AFFRAM, K. ; SYMES, A. J. LPS antagonism of TGF- β signaling results in prolonged survival and activation of rat primary microglia. **J Neurochem.** 2013.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43, n.2, 109-42, 1991.

MOSCA, P. J. *et al.* A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. **Blood.** v. 96, p. 10, p. 3499–3504, 2000.

MULLER, U.; STEINHOTT, U.; REIS, C. F. L.; HEMMI, S.; PAVLOVIC, J.; ZINKERNAGEL, R. M.; AGUET, M. Functional role of type-I and type-II interferons in antiviral defense. **Science.** p. 264, p. 1918–1921. 1994.

NAKAMURA, Y. Regulation factors for microglial activation. **Biol. Pharm. Bull.** v. 25, n. 8, p. 945-953, 2002.

NANSEN, A.; MARKER, O.; BARTHOLDY, C.; THOMSEN, A. R. CCR2+ and CCR5+ CD8+ T cells increase during viral infection and migrate to sites of infection. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 7, p. 1797-806, 2000.

NAVASCUES, J. *et al.* Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. **An Acad. Bras. Cienc.** v. 72, p. 91-102, 2000.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science.** v.308, p. 1314–18, 2005.

NGUYEN, T. *et al.* DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 3030-3034, 1992.

NGUYEN, K. B. *et al.* Coordinated and Distinct Roles for IFN- γ , IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. **J Immunol.**, v. 169, p. 4279-4287, 2012.

OBERHEIM, N. A.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. **Methods Mol Biol.**, v. 814, p. 23-45, 2012.

ORANGE, J. S. *et al.* Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha\beta$, and TNF effects on antiviral state and NK cell response during murine cytomegalovirus infection. **J Immunol.** v. 156, p. 4746, 1996.

OWENS, T.; WHEELER, R. D.; ZEHNTNER, S. P. **Cytokines in CNS inflammation.** In: Cytokines and the CNS. RANSOHOFF, R. M.; BENVENISTE, E. N. 2thed. Florida, 2006

PAOLICELLI, R. C.; BOLASCO, G.; PAGANI, F.; MAGGI, L.; SCIANNI, M.; PANZANELLI, P.; GIUSTETTO, M.; FERREIRA, T. A.; GUIDUCCI, E.; DUMAS, L.; RAGOZZINO, D.; GROSS, C. T. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science.** v. 333, p. 1456–8. 2011.

PARK, K. W.; LEE, H. G.; JIN, B. K.; LEE, Y. B. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. **Exp Mol Med**, v. 39, n. 6, p. 812-819, 2007.

PEKKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia.** v. 50, p. 427–434, 2005.

PINHEIRO, F. P. *et al.* Aspectos clínicos-epidemiológicos dos arbovírus. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição as Ciências Biológicas e a Medicina Tropical.** v. 1, p. 375-408.1986.

PINHEIRO, P. F., TRAVASSOS DA ROCHA, A. P. A. *et al.* Arboviroses. In: Veronese, R., R. Focaccia. **Tratado de Infectologia.** São Paulo: Ateneu, p. 169-180. 1997

PLAKHOV, I. V.; ARLUND, E. E.; AOKI, C.; REISS, C. S. The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. **Virology.** v. 209, p. 257–262, 1995.

POPE, M.; MARSDEN, P. A.; COLE, E.; SLOAN, S.; FUNG, L. S.; NING, Q.; DING, J. W.; LEIBOWITZ, J. L.; PHILLIPS, M. J.; LEVY, G. A. Resistance to murine hepatitis virus strain 3 is dependent on production of nitric oxide. **J Virol**, v. 72, n. 9, p. 7084-7090, 1998.

RAHMAN, M. M.; MCFADDEN, G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. **PLoS Pathog**, v. 2, p. 66-77, 2006.

RANSOHOFF, R. M. & BENVENISTE, E. T. **Cytokines and the CNS**. New York: CRC Press. 2thed. 2006.

RASHMI JALAH, *et al.* The p40 subunit of interleukin (IL-12) promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production. **J Biol Chem**. v. 288, n. 9, p. 6763-76, 2013 .

RAO, T. S. *et al.* Glutamate-dependent glutamine, aspartate and serine release from rat cortical glial cell cultures. **Brain Res.**, v.18, 978, n.1-2, p.213-22, 2003.

REED, L. S.; MUENCH, H. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hygiene**. v. 27, p. 493-497, 1938.

REISS, C. S.; AOKI, C. Vesicular stomatitis virus: immune recognition, responsiveness, and pathogenesis of infection in mice. **Med Virol**. v. 4, p. 129–140, 1994.

REINERT, L. S.; HARDER, L.; HOLM, C. K.; IVERSEN, M. B.; HORAN, K. A. *et al.* TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. **J Clin Invest**. v. 122, p. 1368–1376, 2012.

REMPEL, J. D.; MURRAY, S.J.; MEISNER, J.; BUCHMEIER, M.J. "Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis." **Virology**. v. 318, p. 381-392. 2004.

RICE, S. A.; LAM, V.; KNIPE, D. M. The acidic amino-terminal region of herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27 is required for an essential lytic function. **J Virol**, v. 67, n. 4, p. 1778-1787, 1993.

RODRIGUEZ, M. *et al.* Gamma Interferon Is Critical for Neuronal Viral Clearance and Protection in a Susceptible Mouse Strain following Early Intracranial Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 12252-12265, 2003.

RODRIGUEZ, J.J.; OLABARRIA, M.; CHVATAL, A.; VERKHRATSKY, A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. **Cell Death Differ**. v. 16, p. 378–385, 2009.

RODRÍGUEZ, J. J.; VERKHRATSKY, A. Neuroglial Roots of Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol**, v. 43, p. 87-96, 2011.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. **Nat Rev Neurosci**. v.10, n. 3, p. 235-41. 2009.

ROSKAMS, A. J.; BREDT, D. S.; DAWSON, T. M.; RONNETT, G. V. Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. **Neurons**. v. 13, p. 289–299, 1994.

ROTTENBERG, M.; KRISTENSSON, K. Effects of interferon-gamma on neuronal infections. **Viral Immunol**. v. 15, p. 247-260, 2002.

ROULSTON, A.; MARCELLUS, R.C.; BRANTON, P.E. "Viruses and apoptosis." **Annu Ver Microbiol**. v. 53, p. 577-628. 1999.

ROUSSARIE, J. P.; RUFFIE, C.; BRAHIC, M. The role of myelin in Theiler's virus persistence in the central nervous system. **Plos Pathog.**, v. 3, n. 2, e23, 2007a.

ROUSSARIE, J. P. *et al.* Axon Myelin Transfer of a Non-Enveloped Virus. **Plos One**, v. 2, n. 12, p. 1331, 2007b.

ROZENFELD, C. *et al.* Soluble factors released by Toxoplasma dondii-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated and prevent neuronal degeneration. **Infection and Immunity**. In Press. 2003

RUBIO-PEREZ, J. M.; MORILLAS-RUIZ, J. M. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. **The Scientific World Journal**, v. 15, article ID 756357, 2012.

RUTLEDGE, B. J.; RAYBURN, H.; ROSENBERG, R.; NORTH, R. J.; GLADUE, R. P.; CORLESS, C. L.; ROLLINS, B. J. High level monocyte chemoattractant protein-1 expression in transgenic mice increases their susceptibility to intracellular pathogens. J. Immunol. v. 155, n. 10, p.4838-43, 1995.

SAIJO, K.; CROTTI, A. GLASS, C. K. Regulation of Microglia Activation and Deactivation by Nuclear Receptors. **Glia**, v. 61, p. 104-111, 2013.

SAMANTHA R. FURR AND IAN MARRIOTT . Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. **Front Microbiol**. v. 3, p. 201, 2012.

SCHNEIDER-SCHAULIES J.; SCHNEIDER-SCHAULIES S.; TER MEULEN V. Differential induction of cytokines by primary and persistent measles virus infections in human glial cells. **Virology**. v. 195, p.219 – 228, 1993.

SCHOENHAUT, D. S.; CHUA, A. O.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; DWYER, C.M.; MCCOMAS, W.; FAMILLETTI, P.C.; GATELY, M.K.; GUBLER, U. Cloning and expression of murine IL-12. **J. Immunol**. v. 148, p. 3433–3440. 1992.

SEGUIN, M. C. *et al.* Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated plasmodium berghei infected mosquitoes involvement of interferon gamma and CD8 T cells. **J. Exp. Med**. v.180, p. 353-358, 1994.

SEO, D. R.; KIM, K. Y.; LEE Y. B. Interleukin-10 expression in lipopolysaccharide-activated microglia is mediated by extracellular ATP in an autocrine fashion. **Neuroreport**. v. 15, p. 1157–1161, 2004.

SIERRA, A.; ENCINAS, J. M.; DEUDERO, J. J.; CHANCEY, J. H.; ENIKOLOPOV, G.; OVERSTREET-WADICHE, L. S.; TSIRKA, S. E.; MALETIC-SAVATIC, M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**. v. 7, p. 483–95, 2010.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. Cytokines in anaesthesia. **Br J Anaesth**. v. 78, p. 201-19, 1997.

SHINDO, N.; ALCANTARA, L. C.; VAN DOOREN, S.; SALEMI, M.; COSTA, M. C.; KASHIMA, S.; COVAS, D. T.; TEVA, A.; PELLEGRINI, M.; BRITO, I.; VANDAMME, A. M.; GALVÃO-CASTRO, B. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 18, p. 71-7, 2002.

SHU, S. Y.; JU, G.; FAN, L. Z. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett**. v.85(2), p.169-71. 1988.

SILVA, C. A.; OLIVEIRA, A. C.; VILAS-BOAS, L.; FINK, M. C.; PANNUTI, C. S.; VIDAL, J. E. Neurologic cytomegalovirus complications in patients with AIDS: retrospective review of 13 cases and review of the literature. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 52, n. 6, p. 305-10, 2010.

SNELL, R. S. **Anatomia**. 5th ed. Rio de Janeiro: Médica Científica. p. 721-727 , 2003.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**. v. 32, p. 12, p. 638-47. 2009.

SOLA, C.; CASAL, C.; TUSELL, J. M.; SERRATOSA, J. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 1275-1283, 2002.

SOUSA, A. E.; CARNEIRO, J.; MEIER-SHELLERSHEIM, M.; GROSSMAN, Z.; VICTORINO, R. M. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. **Immunol**. v. 15; n. 6, p. 3400-6, 2002.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na

síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arq Bras Cardiol.** V.90, p. 94-99. 2008.

SRIRAM, K.; MATHESON, J. M.; BENKOVIC, S. A.; MILLER, D. B.; LUSTER, M. I.; O'CALLAGHAN, J. P. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. **Faseb J.** v. 20, n. 6, p. 670–82. 2006.

STALDER, A. K.; PAGENSTECHE, A.; YU, N. C.; KINCAID, C.; CHIANG, C. S.; HOBBS, M. V.; BLOOM, F. E.; CAMPBELL, I. L. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. **J Immunol.** v. 159, n. 3, p. 1344–1351, 1997.

STANGER, S. *et al.* Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** v.180, p. 783-793, 1994.

STEEL, C. D.; HAHTO, S. M.; CIAVARRA, R. P. Peripheral dendritic cells are essential for both the innate and adaptive antiviral immune responses in the central nervous system. **Virology.** v. 387, p. 117–126, 2009.

STELLA, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. **Neuropharmacology,** v. 56, n. 1, p. 244-253, 2009.

STREIT, W. J. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. **J Neurosci Res,** v. 77, n. 1, p. 1-8, 2004.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol.** v. 57, p. 563–81. 1999.

SUZUMURA, A.; SAWADA, M.; YAMAMOTO, H.; MARUNOUCHI, T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. **J Immunol.** v. 15; n. 4, p. 2150-8, 1993.

TANABE, K.; MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R.; YAMAGUCHI, S.; IIDA, H.; DOHI, S.; KOZAWA, O. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. **J Neuroinflammation.** v. 7, p.16, 2010.

TAUB, D. D.; A. R.; LLOYD, A. R.; CONLON, K.; WANG, J. M.; ORTALDO, J. R.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K. ; KELVIN, D. J.; OPPENHEIM, J. J. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. **J. Exp. Med.** v. 177, p. 1809–1814, 1993.

TESCH, G. H.; MAIFERT, S.; SCHWARTING, A.; ROLLINS, B. J.; KELLEY, V. R. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in *MRL-Fas^{lpr}* mice. **J. Exp. Med.** 190:1813. 1999.

TORDO, N.; BENMANSOUR, A.; CALISHER, C. Rhabdoviridae. In *Virus Taxonomy*, Eighth Report of the International **Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 623–644.. 2004.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. *et al.* Carajás and Marabá viruses, to new vesiculovirus isolated from phlebotomine sand flies in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hig.**, v. 33, n. 5, p. 999-1006, 1984.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; PINHERO, F.P. Arboviroses. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. LEÃO, R.N.Q., Belém: Cejup: UEPA: **Instituto Evandro Chagas**. p. 207-226. 1997.

TREMBLAY, M. E.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS Biol**, p. 8, e1000527, 2010.

TRINCHIERI, G.; WYSOCKA, M.; D'ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; ASTE-AMEZAGA M.; KUBIN, M.; VALIANTE, N. M.; CHEHIMI, J. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. **Prog. Growth Factor Res.** v. 4, p. 355–368, 1992.

TURRIN, N. P. Central nervous system Toll-like receptor expression in response to Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelination disease in resistant and susceptible mouse strains. v. 5, n. 154, 2008.

UNGER, J.W. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. **Microsc. Res. Tech.** v. 43, p. 24–28.1998.

VALENZUELA, J.; SCHMIDT, C.; MESCHER, M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. **J Immunol.** v. 169, p. 6842–6849. 2002.

VANGURI, P., AND J. M. FARBER. IFN and virus-inducible expression of an immediate early gene, *crg-2/IP-10*, and a delayed gene, *I-Aa*, in astrocytes and microglia. **J. Immunol.** v. 152, p. 1411–1418. 1994.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia Brasileira. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo-SP, v. 33, n. 6, p. 465-467, 1991.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS-DA-ROSA, E. S.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J. F. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad Saúde Pública** 2001; v. 17, p. 155-64. 2001.

VERKHRATSKY, A. *et al.* Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. **ASN Neuro Review**, v. 4, n. 3, p. 131-149, 2010.

VIGNALI, D. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines. Immunological playmakers. **Nat. Immunol.** v. 13, p. 722–728. 2012.

WAGNER, R. P.; ROSE, R. J. K. Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Virology**. 3ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, cap. 37, p. 1121-1129, 1996.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; JINNO, S.; KOHSAKA, S.; NABEKURA, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **J Neurosci.** v. 29, p. 3974–80. 2009.

WANG, T.; SCULLY, E.; YIN, Z.; KIM, J. H.; WANG, S. IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. **J Immunol.** v.171, p. 2524-2531. 2003.

WENG, K. F.; CHEN, L. L.; HUANG, P. N.; SHIH, S. R. Neural pathogenesis of enterovirus 71 infection. **Microbes Infect.** v. 12, n. 7, p. 505-10, 2010.

WILLOUGHBY, R. E. JR.; TIEVES, K. S.; HOFFMAN, G. M.; GHANAYEM, N. S.; AMLIE-LEFOND, C. M.; SCHWABE, M. J.; CHUSID, M. J.; RUPPRECHT, C. E. Survival after treatment of rabies with induction of coma. **Engl J Med.** v. 16, n. 24, p. 2508-14, 2005.

WINK, D.; KASPRZAK, K. S.; MARAGOS, C. M.; ELESURU, R. K.; MISRA, M.; DUNAMS, T. M.; CEBULA, T. A.; KOCH, W. H.; ANDREWS, A. W.; ALLEN, J. S. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science**, v. 254, n. 5034, p. 1001-1003, 1991.

WOICIECHOWSKY, C; SCHONING, B; STOLTENBURG-DIDINGER, G; STOCKHAMMER, F; VOLK, H. D. Brain-IL-1 beta triggers astrogliosis through induction of IL-6: inhibition by propranolol and IL-10. **Med Sci Monit.** v. 10, n. 9, p. 325–30, 2004.

WOHL, S. G.; SCHMEER, C. W.; WITTE, O. W.; ISENMANN, S. Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 5, p. 2686–96, 2010.

WONG G. K. T., MARSDEN P.A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nefrol Dial Transplant.** v.11, p. 215-20. 1996.

WOLF, S. F.; SIEBURTH, D.; SYPEK, J. Interleukin 12: a key modulator of immune function. **Stem Cells.** v. 12, n. 2, p. 154-68, 1994.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clin Chim Acta**. V. 11, p. 411(21-22), 2010.

YAMABE, T.; DHIR G.; COWAN, E. P.; WOLF, A. L.; BERGEY, G. K.; KRUMHOZ, A.; BARRY, E.; HOFFMAN, P. M.; DHIB-JALBUT, S. Cytokine-gene expression in measles-infected adult human glial cells. **J Neuroimmunol**. V. 49, P. 171 -179, 1994.

YOSHIDA, A.; KOIDE, Y.; UCHIJIMA, M.; YOSHIDA, T. O. IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 198, p. 857–61, 1994.

XU, M.; MIZOGUCHI, I.; MORISHIMA, N.; CHIBA, Y.; MIZUGUCHI, J.; YO- SHIMOTO, T. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. **Clin. Dev. Immunol**. 2010

ZHANG, S.; S. C.; GOETZ, S. C.; DUNCAN, I. D. Suppression of activated microglia promotes survival and function of transplanted oligodendroglial progenitors. **Glia**, v. 41, p.191-198, 2003.

ZHANG, R. L. *et al*. Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, p. 1201-1212, 2007.

ZIELASEK, J.; HARTUNG, H. P. Molecular mechanisms of microglial activation. **Adv Neuroimmunol**. v. 6, p. 191-22. 1996.

CEUA




Protocolo nº 06/2013

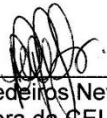
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto nº 006/2013, intitulado “Impacto do ambiente enriquecido sobre o curso temporal da infecção do vírus Marabá em modelo murino senil: ensaios comportamentais e neuropatológicos” sob a responsabilidade do pesquisador **José Antonio Picanço Diniz Junior** está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC.

Ananindeua-PA, 26 de abril de 2013.



Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
Secretária da CEUA/IEC/SVS/MS



Livia Medeiros Neves Casseb
Coordenadora da CEUA/IEC/SVS/MS