



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

LEILANE DE HOLANDA BARRETO

**NEUROPATOLOGIA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELOS RABDOVÍRUS
ITACAIUNAS E CURIONOPOLIS: UM ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA**

**BELÉM-PA
2011**

LEILANE DE HOLANDA BARRETO

**NEUROLOGIA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELOS RABDOVÍRUS
ITACAIUNAS E CURIONOPOLIS: UM ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA**

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

Orientador: Dr. José Antônio Picanço
Diniz Junior

**BELÉM-PA
2011**

LEILANE DE HOLANDA BARRETO

**NEUROPTOLOGIA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELOS RABDOVÍRUS
ITACAIUNAS E CURIONOPOLIS: UM ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. José Antonio Picanço Diniz Jr.
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Avaliadora: Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Avaliadora: Dra. Márcia Consentino Kronka Sosthenes
Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Para Honra e Glória do Senhor Jesus Cristo.

E às duas pessoas mais importantes da minha vida:

José Barreto Filho e Emília Barbosa de Holanda.

Pai, mãe... Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor, por Teu imenso amor, por me guiar e me proteger por toda a minha vida. Agradeço-Te por teres permitido que eu contemplasse alguns detalhes da Tua maravilhosa criação. Para sempre serei agradecida!

À minha família, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando. Por tudo o que vocês representam em minha vida: porto seguro! Amo vocês!

Ao meu orientador, José Antonio Diniz, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, pela amizade, pelo incentivo, pela paciência, pela compreensão em todos os momentos e dedicação ao trabalho desenvolvido.

À minha amiga Natália Mata Longo pela sua preciosa amizade, grande ajuda e compreensão durante o desenvolvimento desse trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho, Alice Queiroz e Natalie Chaves, pelo carinho, paciência, companhia e grande ajuda na realização desse trabalho. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos!

À Dra. Sueli Kataoka, pela sua paciência e amizade. Agradeço também pela sua atenção na correção desse trabalho. Obrigada professora!

Aos meu colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica: Zaire, Diego, Tamirys, Maysa, Marina, Aline, Allan, Lúcia, Francinete, pelo excelente convívio e ajuda recebida. E a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Cristóvam Diniz, pela estrutura oferecida para a realização das técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas e análise estereológica.

Às seções de Hepatologia e Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas pela estrutura oferecida para realização dos testes imunoenzimáticos.

Ao Instituto Evandro Chagas, por possibilitar o desenvolvimento do presente trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À Universidade federal do Pará.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

EPIGRAFE

**Confie no Senhor de todo o coração e
não se apóie na sua própria inteligência.
Lembre de Deus em tudo o que fizer,
e Ele lhe mostrará o caminho certo.**

Pv. 3: 5-6

RESUMO

Muitos esforços têm sido dedicados para o entendimento da neuropatogênese das encefalites virais a partir de trabalhos experimentais. Porém, poucos estudos investigaram a neuropatologia experimental de rabdovírus amazônicos, como a induzida pelos vírus Itacaiunas e Curionópolis, recentemente agrupados em um novo gênero denominado *Bracorhabdovirus*, proposto para a família *Rhabdoviridae*. Esses vírus apresentam tropismo por neurônios do SNC de camundongos neonatos infectados experimentalmente, entretanto, pouco se conhece a respeito da resposta imune do SNC contra esses agentes. O presente trabalho analisou aspectos da resposta imune de células residentes do SNC de camundongos neonatos, após infecção experimental pelos vírus Itacaiunas e Curionópolis, *in vivo* e *in vitro*. Para alcançar esses objetivos, foram utilizadas técnicas histoquímica e imunohistoquímica para detecção de microglias ativadas e astrócitos, respectivamente, em seções de cérebros de camundongos infectados. A quantificação das células ativadas foi realizada em regiões do hipocampo, utilizando técnicas estereológicas. Além disso, foi investigada a expressão de citocinas pró e antiinflamatórias produzidas por células do SNC em cultivos primários infectados com os vírus Itacaiunas e Curionópolis por ensaios imunoenzimáticos (ELISA), a partir de sobrenadantes de co-culturas enriquecidas de microglias/neurônios e de astrócitos/neurônios. Foi também analisada a expressão de óxido nítrico por citoquímica utilizando o reagente DAF-FM diacetato (*4-amino-5-methylamino-2,7'-difluorofluorescein diacetate*). Os resultados mostraram que cérebros de camundongos infectados com os vírus Curionópolis 2d.p.i. e Itacaiunas 4 e 7d.p.i. apresentaram discreta ativação microglial, porém, em camundongos infectados com o vírus Curionópolis 5d.p.i. houve intensa ativação. A imunohistoquímica revelou marcação de poucos astrócitos em animais infectados com os vírus Curionópolis 2d.p.i. e Itacaiunas 4 e 7d.p.i. no hipocampo. Por outro lado, nos camundongos infectados com Curionópolis 5d.p.i., houve aumento de astrócitos, principalmente na região da fissura hipocampal. Os resultados obtidos a partir dos ensaios imunoenzimáticos mostraram que houve grande produção de IL-12p40 nas culturas de células do SNC infectadas com os vírus, 48 e 96h.p.i. Baixos níveis de TGF- β foram detectados após 48 horas de infecção com os vírus em estudo, no entanto, observou-se aumento da expressão dessa citocina após 96h.p.i. Também foi demonstrado, com 48 horas de infecção, baixos níveis da citocina IL-10, aumentando após 96 horas para ambos os vírus, principalmente nas co-culturas enriquecidas de microglias/neurônios infectados pelo vírus Itacaiunas. Culturas de células do SNC infectadas com os vírus Itacaiunas 48 e 96h.p.i. e Curionópolis 48h.p.i. mostraram discreta produção de óxido nítrico, porém houve aumento nessa produção em culturas infectadas com o vírus Curionópolis 96h.p.i. Esses resultados sugerem que há predominância de uma resposta pró-inflamatória nos tempos iniciais da infecção para ambos os vírus e uma tentativa de modulação dessa resposta com a produção de citocinas antiinflamatórias nos tempos tardios.

Palavras chaves: Imunidade inata, Sistema Nervoso Central, Vírus Itacaiunas, Vírus Curionópolis

ABSTRACT

Experimental studies are making many efforts to understand the neuropathogenesis of viral encephalitis. However, a few is known about the Central Nervous System (CNS) response against amazonic rhabdovirus. The virus Itacaiunas e Curionopolis were classified preliminary as members of the Rhabdoviridae family. It was suggested for these virus to be included in a new genus, Bracorhabdovirus. They are neurotropic virus and little is known about the inflammatory response of the CNS against these virus. This study examined aspects of the immune response of newborn mice CNS resident cell after experimental infection by Itacaiunas and Curionopolis virus, *in vivo* and *in vitro*. To achieve these goals, histochemical and immunohistochemical techniques were used to detect activated microglia and astrocytes, respectively, in sections of the brains of infected mice. The quantification of these cells were performed in hippocampal regions using stereological techniques. Furthermore, was investigated the expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines produced by CNS cells in primary cultures infected with virus Itacaiunas and Curionopolis by using enzyme immunoassay (ELISA) from supernatants co-cultures enriched of microglia/neurons and astrocytes/neurons. The expression of nitric oxide was also analyzed by using cytochemical reagent DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamine-2,7-difluorofluorescein-diacetate). As a result, age matched control animals of each group did not present activated microglia or astrocytosis, as well as, both Curionopolis and Itacaiunas infected subjects early after the inoculation (2d.a.i. and 4d.a.i. respectively). However at 5th d.a.i., Curionopolis infections significant increase in the number of activated microglia and reactive astrocytes were detected whereas at the 7th d.a.i. after Itacaiunas infection only minimal activation of microglia and reactive astrocytosis was detected. The results from immunoassays showed great production of IL-12p40 in cultures of CNS cells infected with both virus, 48 and 96 hours after infection (h.a.i.). Low levels of TGF- β and IL-10 were detected after 48 hours of infection with both virus, however, was observed increased expression of this cytokines after 96 hours. CNS cell cultures infected with Curionopolis virus 48h.p.i. and Itacaiunas virus 48 and 96h.a.i. showed a slight production of nitric oxide, but it was increased in cultures infected with Curionopolis virus 96h.a.i. These results suggest that the proinflammatory response is dominant in both virus, however, it seems that the anti-inflammatory cytokines try to modulate the inflammatory response of the late days pos-inoculation.

Key words: Innate immunity, Central Nervous System, Itacaiunas virus, Curionopolis virus

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mapa do Estado do Pará, mostrando a área de captura dos culicídeos infectados com os vírus Itacaiunas e Curionópolis, em Serra Norte município de Parauapebas	2
Figura 2: Desenho esquemático do hipocampo demonstrando sua laminação e o circuito tri-sináptico básico do hipocampo	13
Figura 3: Ilustração da região da fissura hipocampal delimitada e geração da matriz e blocos de contagem com o auxílio do programa Stereoinvestigator em secções de cérebros coradas por imunohistoquímica para detecção de GFAP	20
Figura 4: Micrografias de secções de cérebros de camundongos dos grupos controle e infectados com o vírus Curionópolis 5d.p.i., processados por histoquímica para marcação de microglias ativadas, evidenciando região do hipocampo	28
Figura 5: Micrografias de secções de cérebros de camundongos dos grupos controle e infectados com o vírus Curionópolis 5d.p.i., processados por imunohistoquímica para marcação de GFAP, evidenciando região do hipocampo	31
Figura 6: Representação gráfica do número estimado de astrócitos ativados através do fracionador óptico na fissura hipocampal	31
Figura 7: Micrografia de fluorescência mostrando a marcação de antígenos virais em neurônios 3d.p.i.	32
Figura 8: Fotomicrografias de fluorescência mostrando proteínas marcadoras celulares	33
Figura 9: Análise da expressão da citocina IL-12p40 em co-culturas primárias enriquecidas de astrócitos/neurônios (Astr/Neu) e de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com o vírus Itacaiunas, 48 e 96 h.p.i.	34

Figura 10: Análise da expressão da citocina IL-12p40 em co-culturas primárias enriquecidas de astrócitos/neurônios (Astr/Neu) e de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com o vírus Curionópolis, 48 e 96 h.p.i.	35
Figura 11: Análise da expressão da citocina IL-10 em co-culturas primárias enriquecidas de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com os vírus Itacaiunas e Curionópolis 96h.p.i.	36
Figura 12: Análise da expressão da citocina TGF- β em co-culturas primárias enriquecidas de astrócitos/neurônios (Astr/Neu) e de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com o vírus Itacaiunas e com o vírus Curionópolis, 96 h.p.i.	36
Figura 13: Fotomicrografias de fluorescência mostrando o produto da reação do óxido nítrico com DAF-FM em culturas de neurônios	38
Figura 14: Fotomicrografias de fluorescência mostrando o produto da reação do óxido nítrico com DAF-FM em co-culturas de células gliais/neurônios	39
Tabela 1: Estimativa estereológica de microglias ativadas na região de CA3 do hipocampo do grupo de animais infectados com Curionópolis 5d.p.i.	29
Tabela 2: Estimativa estereológica de astrócitos na região da fissura hipocampal dos grupos de animais controle e animais infectados com Curionópolis 5d.p.i.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC – Complexo de Demência da AIDS

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

ASF – *Area sampling fraction* - Área da caixa/Área matriz

BDV – *Borna disease virus*

BHE – Barreira Hematoencefálica

BSA – Albumina Bovina

CA – Corno de Amon

CE – Coeficiente de Erro

CEPAN/IEC – Comitê de Ética em Pesquisa Animal/Instituto Evandro Chagas

cNOS – Óxido Nítrico Sintase Constitutiva

CR3 – Receptor do Complemento Tipo 3

CTL – Controle

CV – Coeficiente de Variação

CVB – Coeficiente de variação biológica

d.p.i – dias pós-inoculação

DMEM F12 – Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium

DP – Desvio Padrão

EAE – Encefalomielite Alérgica Experimental

ECP – Efeito Citopático

EPCs – Equipamentos de Proteção Coletiva

EPIs – Equipamentos de Proteção Individual

G-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos

GD – Giro Denteado

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar Glial

GND – Glicose oxidase/Níquel/DAB

HBSS - Solução Balanceada de Hanks'

h.p.i. – horas pós inoculação

ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular 1

IEC – Instituto Evandro Chagas

IFN - Interferon

IL – Interleucina

i.n. - intranasal

INF – Infectado

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzível

JEV - *Japanese encephalitis virus*

Kit M.O.M. – Kit Vector Mouse on Mouse

LIF – Fator Inibidor de Leucemia

LPS - Lipopolissacarídeo

M-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Monócitos

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MCP – Proteína Quiomiotática de Monócitos

MIP – Proteína Inflamatória de Macrófago

mRNA – RNA mensageiro

N – Número total de objetos

NGF – Fator de Crescimento de Nervos

NK – Natural Killer

NOS – Óxido nítrico sintase

ON – Óxido Nítrico

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PBS-T – Solução Salina Tamponada com Fosfato e Tween 20

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

ΣQ – Número de objetos contados

SFB – Soro Fetal Bovino

SEARB – Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso periférico

SSF – *Section sampling fraction* - Secções contadas/Total de secções

T.A. – Temperatura Ambiente

TMEV - *Theiler's murine encephalomyelitis virus*

TGF – Fator de Crescimento Transformante

TLRs – Receptores Toll-like

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TSF – *Tissue sampling fraction* - Altura bloco/Espessura da secção

VSV – Vírus da Estomatite Vesicular

LISTA DE REAGENTES

Ácido bórico - Synth, Diadema, SP, Brasil

Ácido sulfúrico - Merck, Darmstadt, Alemanha

Albumina bovina - Bio Basic Inc., Markham, ON, Canadá

Anticorpo secundário (Imunofluorescência) - Sigma, St. Louis, MO, USA

Anti-GFAP (Imunohistoquímica) - Millipore, Billerica, MA, EUA

Anti-GFAP (Imunofluorescência) - Dako, Alemanha

Anti-neurofilamento - Sigma, St. Louis, MO, EUA

Avertina - Sigma, St. Louis, MO, EUA

Azul de Tripán - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Bicarbonato de sódio - Sigma, St. Louis, MO, EUA

Cloreto de amônio - Merck, Darmstadt, Alemanha

Cloreto de sódio - Cromoline, Diadema, SP, Brasil

Cresil-violeta - Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA

D-glicose - Sigma, St. Louis, MO, EUA

DAF-FM *diacetate* - Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

DMEM F-12 - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Entellan - Merck, Darmstadt, Alemanha

Estraptavidina/Peroxidase - Vector Laboratories, Inc Burlingame, CA, USA

Etanol - Merck, Darmstadt, Alemanha

Glutamax - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Heparina - Hipolabor, Belo Horizonte, MG, Brasil

HEPES - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Isolectina B4 - Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

Kit da lectina *Lycopersicum esculentum* - Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

Kit VECTOR VIP - Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

L-glutamina - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Metanol - Merck, Darmstadt, Alemanha

Neurobasal - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Paraformaldeído - Sigma, St. Louis, MO, USA

Penicilina/Estreptomicina - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Peróxido de hidrogênio - Spectrum, Gardena, CA, EUA

Piruvato de sódio - Sigma, St. Louis, MO, EUA

Poli-L-ornitina - Sigma, St. Louis, MO, EUA

Reagente ABC - Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

RPMI 1640 - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Solução balanceada de Hanks' – Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Soro bovino fetal - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Soro normal de cabra - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Suplemento B27 - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Tripsina-EDTA - Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

Triton X-100 - Sigma, St. Louis, MO, EUA

Tween 20 - Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA

Vector Mouse on Mouse Basic KIT - Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 RABDOVÍRUS	1
1.2 RESPOSTA IMUNE DO SNC	3
1.2.1 Astrogliose	5
1.2.2 Ativação microglial	6
1.2.3 Citocinas	7
1.2.4 Óxido nítrico (ON)	12
1.3 HIPOCAMPO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA	16
3.2 CEPAS VIRAIS	16
3.3 ANIMAIS	16
3.4 PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO	17
3.4.1 Fixação por perfusão	17
3.4.2 Processamento histoquímico para detecção de microglias ativadas	17
3.4.3 Processamento imunohistoquímico para detecção de astrócitos	18
3.5 ESTEREOLOGIA	19
3.6 ESTATÍSTICA	21
3.7 CULTURAS PRIMÁRIAS	23
3.7.1 Cultura mista de células gliais	23
3.7.2 Cultura enriquecida de neurônios	23
3.7.3 Co-cultura enriquecida de astrócitos/neurônios	24
3.7.4 Co-cultura enriquecida de microglias/neurônios	24
3.7.5 Inoculação dos vírus em culturas primárias	25
3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	25

3.9 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	26
3.10 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	27
4 RESULTADOS	28
4.1 DETECÇÃO DE MICROGLIAS ATIVADAS	28
4.2 DETECÇÃO DE ASTRÓCITOS	30
4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	32
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	33
4.5 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	37
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO A	64
ANEXO B	65
ANEXO C	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 RABDOVÍRUS

Os vírus da família *Rhabdoviridae* são talvez os mais amplamente distribuídos na natureza. Eles podem infectar invertebrados, vertebrados, assim como muitas espécies de plantas (WAGNER e ROSE, 1996). Essa família é constituída por seis gêneros: *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus* (MURPHY, 1996; TORDO et al., 2005).

Nessa família, dois gêneros estão relacionados com a infecção de muitas espécies de mamíferos e, ocasionalmente, o homem: os *Lyssavirus*, que comporta três grupos antigênicos (Rabies, Bovine ephemera fever e Tibrogargan), e os *Vesiculovirus*, com um grupo antigênico (Stomatite vesicular) (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997). Outros grupos antigênicos, tais como Hart Park, Kwatta, Timbo e Mossuril, pertencem à família *Rhabdoviridae*, mas não pertencem a nenhum dos gêneros citados. Existem ainda outros vírus na família, porém não soroagrupados (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

Recentemente, um novo gênero, chamado *Bracorhabdovirus*, foi proposto para esta família baseado no seqüenciamento de nucleotídeos, reações sorológicas e morfologia ultraestrutural de duas espécies, os vírus Itacaiunas e Curionopolis. Essas espécies foram isoladas de mosquitos-pólvora *Culicoides* (também conhecidos regionalmente como “maruins”) no município de Parauapebas, Serra Norte, Estado do Pará (Figura 1), em 1984 e 1985, respectivamente (DINIZ et al., 2006).



Figura 1 - Mapa do Estado do Pará, mostrando a área de captura dos culicídeos infectados com os vírus Itacaiunas e Curionópolis, em Serra Norte município de Parauapebas.

Fonte: <http://www.guianet.com.br/pa/mapapa.htm>

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

Diniz e colaboradores (2008), utilizando culturas primárias de células do Sistema Nervoso Central (SNC) de camundongos, constataram que os vírus Itacaiunas e Curionópolis apresentam tropismo por neurônios. Estudos histopatológicos realizados no mesmo trabalho revelaram que as lesões produzidas pelas espécies virais envolveram, sobretudo, o SNC, confirmando achados anteriores para a grande maioria dos arbovírus isolados na Amazônia (DIAS, 1986). Após infecção de camundongos neonatos por instilação nasal, antígenos dos vírus Curionópolis e Itacaiunas foram encontrados nas meninges e bulbo olfatório, alcançando posteriormente o córtex, o hipocampo e o tálamo (DINIZ et al., 2008).

A seqüência de neuroinvasão pelos vírus Curionópolis e Itacaiunas parece ser muito similar àquela apresentada pelo *Vesicular stomatitis virus* (VSV). Quando o VSV foi inoculado intranasalmente em camundongos Balb/c, receptores olfatórios

foram as primeiras células a serem infectadas (PLAKHOV et al., 1995), seguidas pelos neurônios do bulbo olfatório e finalmente conduzidas para uma infecção aguda de outras áreas do cérebro (FORGER et al., 1991; HUNEYCUTT et al., 1994; LUNDH, et al., 1987). A completa eliminação de antígenos virais do parênquima cerebral foi observada em camundongos sobreviventes após 12 dias a contar da inoculação, sem aparente dano ao SNC (FORGER et al., 1991, HUNEYCUTT et al., 1994).

Na família *Rhabdoviridae*, muitas espécies têm sido usadas com sucesso para induzir encefalite experimental em camundongos (VAN DER POEL et al., 2000). A patogênese da invasão viral do SNC envolve muitas etapas distintas, incluindo replicação no sítio de infecção, entrada e distribuição pelo SNC, replicação no tecido neural, resposta imune do hospedeiro e lesões no tecido (CROTTY et al., 2002; FAZAKERLEY, 2004; REMPEL et al., 2004).

1.2 RESPOSTA IMUNE DO SNC

A fase inicial de uma resposta imune efetiva contra um patógeno invasor é essencial para a sobrevivência de um organismo, e é conhecida como resposta imune inata. 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; NGUYEN et al., 2002).

A infecção experimental pelo VSV em camundongos tem sido associada à encefalite aguda, quebra da barreira hematoencefálica (BHE) e alto grau de mortalidade, semelhante ao que é observado nas infecções com o vírus da raiva (HUNEYCUTT et al., 1993). Resultados obtidos a partir da inoculação por via intranasal em camundongos Balb/c depletados de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, mostraram que, embora as células CD4⁺ ou CD8⁺ limitassem a replicação viral e a disseminação transináptica ou ventricular, elas contribuam pouco para o desenvolvimento das alterações histopatológicas observadas. Esses achados sugeriram que a encefalite causada pelo VSV é independente de células T, e que as células residentes do SNC deveriam ter um papel importante na iniciação e/ou progressão da inflamação no SNC (HUNEYCUTT et al., 1993; NANSEN et al., 2000).

Historicamente, o SNC era considerado um local “imune-privilegiado” devido à existência da BHE, a qual previne a passagem de células e muitas moléculas solúveis da circulação sanguínea para dentro do SNC, a falta de drenagem linfática, expressão reduzida do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), aparente ausência de células apresentadoras de antígenos (APCs) e, também, em decorrência de resposta imune incipiente a aloenxertos (ALLAN e ROTHWELL, 2003; BENVENISTE, 1998; NGUYEN et al., 2002; PERRY et al., 1993). Atualmente, sabe-se que um limitado número de células T ativadas pode atravessar a BHE com o objetivo de vigilância imune, e que células residentes do SNC, em particular as células gliais, podem ser ativadas para expressar, liberar e/ou responder a mediadores inflamatórios que funcionam como reguladores da imunidade e moduladores das funções gliais e neuronais (BENVENISTE, 1998; STEINMAN, 2008).

As células gliais, principalmente, astrócitos e microglias, desempenham papéis de destaque na regulação e manutenção das atividades do SNC. Os astrócitos atuam no desenvolvimento dos neurônios, fornecem suporte e auxiliam no reparo de neurônios lesionados, participam na formação e manutenção da BHE, na homeostase de íons e metabólitos, na captura de neurotransmissores e, além disso, agem como células acessórias nos processos inflamatórios da resposta imune (ALOISI et al., 2001; FARINA et al., 2007; KIMOTO et al., 2009). As microglias são células derivadas de precursores da linhagem monocítica oriundos da medula óssea. Essas células, em condições fisiológicas, encontram-se distribuídas por todo o SNC, apresentando morfologia altamente ramificada, pequena quantidade de citoplasma perinuclear, núcleo pequeno, denso e heterocromático (STREIT, 2005). Consideradas as principais células imunes residentes do SNC, as microglias desempenham funções comuns a macrófagos de outros tecidos (ALOISI, 2001; HANISCH, 2002).

Astrócitos e microglias respondem a qualquer dano no tecido nervoso com ações complexas conhecidas por gliose reativa (HENEKA et al., 2010; LEE et al., 2006; STREIT et al., 2004). A gliose reativa envolve mudança dramática na morfologia das células gliais, juntamente com aumento da motilidade, da atividade fagocitária e liberação de mediadores inflamatórios que podem estar envolvidos tanto na neuroproteção quanto na neurodegeneração (BÓRAN et al., 2008; SOLA et al., 2002).

1.2.1 Astroglíose

A produção de mediadores pró-inflamatórios por astrócitos estimula a expressão de moléculas de adesão vascular, atrai células hematogênicas e induz a ativação microglial (DIRNAGL e PRILLER, 2005). Astrócitos reativos são metabolicamente hiperativos com grande número de mitocôndrias e ribossomos. Em nível molecular, essas células aumentam a produção de numerosos mediadores, receptores e canais que são responsáveis pela alteração do estado funcional dessas células (DIRNAGL e PRILLER, 2005).

Os astrócitos reativos são encontrados principalmente ao redor de alguma lesão, constituindo a resposta mais característica do SNC contra lesões tissulares destrutivas, a chamada “cicatriz” glial. Essas células, em seu estado de gliose, são caracterizadas por hipertrofia associada com a profusão de longos e finos prolongamentos. No entanto, o mais notável achado estrutural é a presença de uma coleção de filamentos intermediários, os quais, às vezes, parecem preencher por completo o compartimento citoplasmático (BRAHMACHARI et al., 2006; HOZUMI et al., 1990). Esses filamentos são frequentemente heteropolímeros, largamente constituídos de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e, em menor quantidade, de vimentina (LIN e CAI, 2004; RIDET et al., 1997).

Dependendo do contexto da doença, a astroglíose pode ser considerada benéfica, por promover a sobrevivência de neurônios, através da produção de fatores de crescimento e neurotrofinas que promovem o crescimento de neuritos; ou prejudicial para o funcionamento neuronal, devido à formação de cicatrizes gliais (BENVENISTE 1998; BRAHMACHARI et al., 2006; DONG e BENVENISTE, 2001). Astrócitos podem produzir e responder a um grande número de citocinas, como interleucina (IL)-1, -4, -6, -10, -12, interferon (IFN)- α/β e $-\gamma$, 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. Essas citocinas/quimiocinas têm sido implicadas no desenvolvimento da inflamação dentro do SNC e progressão da doença ou na resolução da mesma (BENVENISTE 1998; DONG e BENVENISTE, 2001).

1.2.2 Ativação microglial

As células microgliais podem ser encontradas moderadamente ativadas em seu papel clássico de fagocitose para manutenção e restauração do SNC. Por outro lado, uma vez ativadas, as microglias começam a proliferar, alteram sua morfologia para forma amebóide e passam a fagocitar células danificadas ou desnecessárias (NAKAMURA, 2002; YANG et al., 2010). O mecanismo inicial para a ativação microglial ainda não está bem estabelecido, muito embora algumas citocinas estejam envolvidas, promovendo ativação ou inibição dessas células (NAKAMURA, 2002).

Uma variedade de marcadores microgliais tem sido usada para localização e identificação dessas células. Dentre esses, podemos destacar o receptor do complemento tipo 3 (CR3), receptor da porção Fc das imunoglobulinas, antígeno membranar F4/80 expresso em camundongo, α -D-galactose que tem afinidade por isolectina B4 (BARRADAS et al., 1998; KIM e NAGAI, 2010) e poli-N-acetil-lactosamina, um açúcar expresso na superfície de microglias ativadas detectável por histoquímica com *Lycopersicum esculentum*, lectina isolada de tomate (ACARIN et al., 1994).

Microglias podem expressar constitutivamente uma variedade de citocinas, como IL-1 β , -6, -8, -10, -12, -15, TNF- α , proteína inflamatória de macrófago (MIP)-1a, MIP-1b, e proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 (HANISCH, 2002; KAUR et al., 2010; KIM e NAGAI, 2010; LYNCH, 2009; ROCK et al, 2004). Quando tratadas com lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de bactérias gram-negativas, respondem com aumento da produção das citocinas IL-6, -8, -10, -12, TNF- α , MIP-1a, MIP-1b, e MCP-1, com exceção da expressão de IL-1 β que permanece inalterada (KIM e NAGAI, 2010).

Devido à complexidade do estudo da ativação glial *in vivo*, esse fenômeno tem sido frequentemente caracterizado por meio de abordagem *in vitro* (SOLA, 2002). Apesar da clara associação entre microglia reativa e processos patológicos, a precisa consequência da ativação microglial na sobrevivência da célula neural e função *in vivo* permanecem incertas. Em cultura, a microglia pode produzir radicais livres, aminoácidos excitatórios, citocinas inflamatórias, bem como, fatores tróficos. Isso sugere que a atividade microglial tem duplo papel: defesa do organismo e envolvimento nos processos patológicos (ROZENFELD et al., 2003; ZHANG, 2003).

As reações gliais têm sido destacadas em modelos experimentais de dano neuronal como isquemia, axotomia (BARRON et al., 1990; GRAEBER e KREUTZBERG, 1986; GRAEBER et al., 1990), estimulação elétrica e lesão neurotóxica (ACARIN et al., 1996; AKIYAMA et al., 1994; JORGENSEN et al., 1993; VAN DENBERG e GRAMSBERGEN, 1993;), além de serem observadas em cérebros humanos com doenças neurodegenerativas (DELACOURTE, 1990; GRAEBER et al., 1990; HAGA et al., 1989).

1.2.3 Citocinas

A resposta imune inata é caracterizada também pela produção de mediadores que podem contribuir diretamente para a atividade antimicrobiana e eliminação do agente ou para a deflagração de cascatas secundárias, podendo induzir aumento da inflamação e dos danos ao hospedeiro. Os produtos gênicos mais bem caracterizados, resultantes da resposta imune inata, são as citocinas (LEE et al., 2006).

Citocinas são pequenas proteínas com peso molecular de 8 a 40.000Da. Originalmente, foram chamadas de linfocinas e monocinas indicando suas fontes celulares, porém, Dinarello (2006) diz que o termo citocina é mais bem empregado, haja vista a maioria das células nucleadas ser capaz de sintetizá-las e responder a elas (ALOISI, 2005).

Essas proteínas agem como mensageiros químicos entre as células, regulam o crescimento, proliferação e diferenciação celular, homeostase e reparo tecidual, e muitos aspectos das respostas imune e inflamatória (ALOISI, 2005; WESEMANN e BENVENISTE, 2005). A atuação das citocinas ocorre através da ligação a receptores específicos na membrana celular da célula-alvo, estabelecendo uma cascata que leva à expressão ou à inativação de inúmeros genes no núcleo celular (ABBAS e LITCHMAN, 2005; WESEMANN e BENVENISTE, 2005). Em células alvo, seus efeitos podem ser inibidos ou estimulados por outras citocinas. Várias delas agem de diferentes maneiras na evolução e resolução da resposta inflamatória (DINARELLO, 2006; KUSHNER, 1998).

A citocina IL-12, por exemplo, atua tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. Originalmente identificada como fator estimulador de células

Natural Killer (NK), a IL-12 é produzida primeiramente por células apresentadoras de antígenos, assim como por microglias/macrófagos, neutrófilos, astrócitos, células dendríticas e linfócitos B (DEL VECCHIO et al., 2007). A proteína funcional 70-75kDa, designada IL-12p70, é um heterodímero composto por uma subunidade de 35kDa (IL-12p35) e outra de 40kDa (IL-12p40) (IRELAND e REISS, 2004; KOMATSU et al., 1998).

Durante a resposta imune inata, a IL-12 induz à produção de IFN- γ por células NK. Em retorno, o IFN- γ estimula o aumento da produção de IL-12 (*feedback* positivo). Também age como um quimiotático direcionando células NK para a região de infecção e aumentando sua atividade citolítica. A IL-12 é também conhecida por ativar macrófagos, aumentar os níveis de TNF- α no soro e estimular a produção de óxido nítrico (ON) em resposta à infecção (IRELAND e REISS, 2004; KOMATSU, 1998). É negativamente regulada pela IL-4 e IL-10, que são potentes citocinas indutoras da resposta do tipo T_h2 (BUXBAUM e SCOTT, 2005; TRIPATHI et al., 2007).

No SNC, juntamente com infiltrado de macrófagos, a microglia tem sido indicada como fonte principal de IL-12 em condições inflamatórias (BECHER et al., 2000; HANISCH, 2002). *In vitro*, microglia expressa mRNA de IL-12p35 e p40 e secreta IL-12p70 bioativa após exposição ao IFN- γ juntamente com LPS (ALOISI, 2005; HANISCH, 2002). Essas células também expressam receptor de IL-12 funcional, cuja estimulação induz a produção de citocinas, incluindo IL-12, e de ON, o que sugere que IL-12 pode também promover ativação da microglia (ALOISI, 2005).

O IFN- γ é uma proteína de 17kDa produzida por um limitado número de células que inclui células T (CD4⁺ e CD8⁺) e células NK. Dentro da população de células T CD4⁺, essa citocina é produzida pela subpopulação T_h1. O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica que tem importância fisiológica na regulação de eventos imunes. Alguns dos efeitos imunes de IFN- γ incluem a habilidade de aumentar a atividade microbicida de macrófagos, estimular células T, ativar células T citotóxicas e NK e estimular a expressão de MHC I e II em várias células (BENVENISTE, 1998; CHESLER e REISS, 2002; ROTTENBERG e KRISTENSSON, 2002).

A presença de IFN- γ no SNC tem sido mostrada em muitas doenças como Complexo de Demência da AIDS (ADC), Esclerose múltipla e Encefalomielite alérgica experimental (EAE), modelo animal de esclerose múltipla (CHESLER e

REISS, 2002; STEINMAN, 2008). Astrócitos expressam o receptor para esta citocina e respondem a ela de várias maneiras. Muitos dos efeitos do IFN- γ em astrócitos parecem promover aspectos de gliose e inflamação, sugerindo uma ação prejudicial dessa citocina dentro do SNC (BENVENISTE, 1998; FARINA et al., 2007). Em astrócitos e células de Schwann, o IFN- γ estimula a expressão de MHC e moléculas de adesão e amplifica os efeitos induzidos por IL-1 β e/ou TNF- α na produção de citocinas, quimiocinas e ON (ALOISI, 2005; FARINA et al., 2007).

Essa citocina é a mais bem conhecida indutora/amplificadora das funções antimicrobiais, citotóxicas, pró-inflamatórias e de apresentação de antígenos em macrófagos e microglias (DECKERT-SCHLÜTER et al., 1999; ALOISI, 2001). Além disso, o IFN- γ potencializa ou ativa a microglia para a produção de citocinas, quimiocinas, proteases e ON (ALOISI, 2005; LYNCH, 2009).

O TNF- α é uma citocina multifuncional. Ele possui funções centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). Exerce papel importante em relação à patogênese de muitas doenças infecciosas e inflamatórias (BRADLEY, 2008; LIN et al., 2007).

O TNF- α está envolvido em diversos tipos de resposta, como no choque séptico, na indução de outras citocinas e na proliferação, diferenciação, necrose e apoptose celular (RAHMAN e MCFADDEN, 2007; MIR et al., 2008). Sua principal função fisiológica é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção, ativando essas células para eliminar os microrganismos invasores (ABBAS e LITCHMAN, 2005; RAHMAN e MCFADDEN, 2007). Quando produzido em pequenas quantidades, o TNF- α atua como um regulador parácrino e autócrino de leucócitos e células endoteliais; porém, em quantidades maiores, atua de forma endócrina contribuindo para efeitos letais (PAUL et al., 2006). Além disso, o TNF- α é crucial para o desenvolvimento embrionário do tecido linfóide e um fator importante para o início da resposta imune inata e adaptativa mediada por células (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

No SNC, macrófagos residentes, astrócitos e microglias são capazes de sintetizar TNF- α , o qual possui ação pró-inflamatória durante a fase aguda (HANISCH, 2002; LUCAS et al., 2006). A microglia é a principal fonte de TNF- α no SNC (HANISCH, 2002). Tem sido demonstrado que essa citocina atua de maneira autócrina e parácrina sobre a microglia e está implicada na ativação crônica dessa célula em doenças neurodegenerativas (MIR et al., 2008).

O TGF- β é produzido por uma variedade de células, incluindo macrófagos, células T, células B e células NK (KEHRL et al., 1986; WAHL, 1994). Pode ocorrer em três isoformas, TGF- β 1, 2 e 3, descritas em mamíferos (BARRAL-NETO et al., 1992; OPAL e DEPALO, 2006). TGF- β 1 é responsável por regular a proliferação e a diferenciação de células, estimular a síntese da matriz extracelular, a angiogênese e a imunomodulação (KEHRL et al., 1986; LING e ROBINSON, 2002; OPAL e DEPALO, 2006).

O TGF- β 1 tem sido indicado como um regulador chave das respostas do cérebro à injúrias e inflamação através da sua habilidade de modular a proliferação de astrócitos e a síntese de matriz extracelular, induzir modificações vasculares e regular a ativação de macrófagos/microglias e recrutamento de leucócitos. Além disso, TGF- β 1 tem atividade neurotrófica, pois inibe apoptose em neurônios e os protege de uma variedade de insultos (KRIEGLSTEIN et al., 2002; HUANG e HUANG, 2005). A expressão de proteínas ou mRNA de TGF- β 1, -2 e -3 aumenta nos sistemas nervosos central e periférico em infecções, doenças autoimunes e neurodegenerativas (LUO et al., 2007; PRATT e MACPHERSON, 1997).

In vitro, astrócitos, células de Schwann e oligodendrócitos expressam mRNA das três isoformas de TGF- β , enquanto que a microglia expressa somente TGF- β 1 (PRATT e MACPHERSON, 1997). O TGF- β 1 causa mudanças na motilidade, morfologia e proliferação de astrócitos e aumenta a produção de muitas citocinas, incluindo a IL-6, o fator inibidor de leucemia (LIF), o fator de crescimento de nervo (NGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (ALOISI, 2005). Essa citocina também promove a diferenciação de oligodendrócitos em cultura e age como potente supressor das funções citotóxicas e pró-inflamatórias da microglia (BENVENISTE, 1998; LYNCH, 2007; VICENT et al., 1997).

A IL-10 é a principal citocina que possui atividade imunossupressora e antiinflamatória produzida por monócitos/macrófagos e subpopulações de células T. A IL-10 inibe diretamente células T, mas também afeta indiretamente as respostas dessas células através da inibição da expressão de MHC, moléculas de adesão e co-estimulatórias, citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas/quimiocinas, prostaglandinas e ON em monócitos/macrófagos e outros tipos de células imunes (ALOISI, 2005; OPAL e DEPALO, 2006).

No SNC, a IL-10 age atenuando sintomas de Esclerose múltipla, doença de Alzheimer, meningite e mudanças de comportamento durante infecções bacterianas

(SWARUP et al., 2007). Astrócitos e microglias ativados são capazes de produzir IL-10, assim como, de expressar receptores com alta afinidade para essa citocina (KIM e NAGAI, 2010; LEDEBOER et al., 2002; STRLE et al., 2001). Em astrócitos, IL-10 inibe a expressão de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e de TNF- α (BENVENISTE et al., 1995); em oligodendrócitos, a IL-10 exerce um efeito protetor contra a citotoxicidade induzida por IFN- γ e LPS (MOLINA-HOLGADO et al., 2001).

In vitro, IL-10 inibe a habilidade da microglia de atuar como APC e de produzir mediadores pró-inflamatórios (ALOISI, 2001; SZCZEPANIC et al., 2001). Microglia produz IL-10 no SNC sob inflamação (JANDER, 1998; ROCK et al., 2004) e secreta IL-10 *in vitro* seguida de infecção ou exposição ao LPS, TNF e IL-6 (BENVENISTE, 1998; HANISCH, 2002). IL-10 derivada de microglia age de maneira autócrina, inibindo as funções pró-inflamatórias dessa célula (FREI et al., 1994; ROCK et al., 2004). A produção dessa citocina é induzida no SNC e SNP seguido por infecção, danos agudos e autoimunidade, desempenhando papel antiinflamatório e neuroprotetor (ROCK et al., 2004; STRLE et al., 2001).

A IL-4 é uma citocina imune regulatória capaz de suprimir a inflamação. Seu papel na regulação da resposta inflamatória no SNC foi demonstrado em modelos de esclerose múltipla em ratos e na EAE (PONOMAREV et al., 2007). Essa citocina é o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células T_H2 a partir de células T CD4⁺ *naive*. As principais fontes de IL-4 são os linfócitos T CD4⁺ da subpopulação T_H2, mastócitos e basófilos ativados (ABBAS e LITCHMAN, 2005; OPAL e DEPALO, 2006).

A IL-4 antagoniza os efeitos ativadores de IFN- γ , inibindo reações imunes mediadas por células e a produção de espécies reativas de oxigênio e ON, além de desempenhar papel fundamental nas reações inflamatórias mediadas por IgE, mastócito/basófilo e de suprimir reações dependentes de macrófagos (AWASTHI et al., 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; ABBAS e LITCHMAN, 2005).

Grande parte do conhecimento sobre produção de citocinas no sistema nervoso deriva de estudos realizados em culturas primárias de células neurais e em modelos animais de doenças neurológicas graves. Este último inclui EAE, modelo para a doença inflamatória e desmielinizante, esclerose múltipla; modelos de danos cerebrais agudos como isquemia, trauma, transecção axonal, danos excitotóxicos e químicos; modelos de doenças neurodegenerativas crônicas, como doença de Alzheimer e doença príon; e infecções experimentais com bactérias, parasitas e

vírus neurotrópicos (ALOISI, 2005; LUCAS et al., 2006; ROCK et al, 2004; STEINMAN, 2008).

1.2.4 Óxido nítrico (ON)

A produção de ON também é uma das respostas à presença de patógenos no organismo, incluindo protozoários, parasitas, fungos, bactérias e vírus (STENGER et al., 1994). Sua produção no SNC é ativada por IL-12, IFN- γ ou TNF- α (BARNA et al., 1996; CHESLER e REISS, 2002; REISS e KOMATSU et al., 1998). Muitos tipos celulares, como neurônios, células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas, são capazes de produzir ON por meio da conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina mediada pela enzima ON-sintase constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio e de calmodulina, e induzível (iNOS), produzida por macrófagos e outras células (CROEN, 1993; CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

A iNOS não é normalmente expressa no cérebro, mas é induzida em astrócitos e microglias por citocinas pró-inflamatórias e componentes patogênicos, como LPS. Quando expressa em altas concentrações, induz a produção de grande quantidade de ON que, em determinadas condições, pode destruir neurônios, inibindo alguns mecanismos intracelulares necessários para a sobrevivência dessa célula (MANDER e BROWN, 2005).

Há evidência de que a produção de ON inibe a replicação viral possivelmente pelo efeito direto sobre o vírus e as células hospedeiras. O ON danifica o DNA viral e/ou liga íons metálicos às proteínas virais que são essenciais à replicação (NGUYEN et al., 1992 RICE et al., 1993; WINK et al., 1991). Esse efeito do ON foi evidenciado 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).

1.3 HIPOCAMPO

O hipocampo é uma região do cérebro que está implicada no controle de várias funções, como memória e aprendizado, e representa uma estrutura com alto grau de complexidade funcional e celular (GÖTZ e BRADE 2005; KIMOTO et al., 2009).

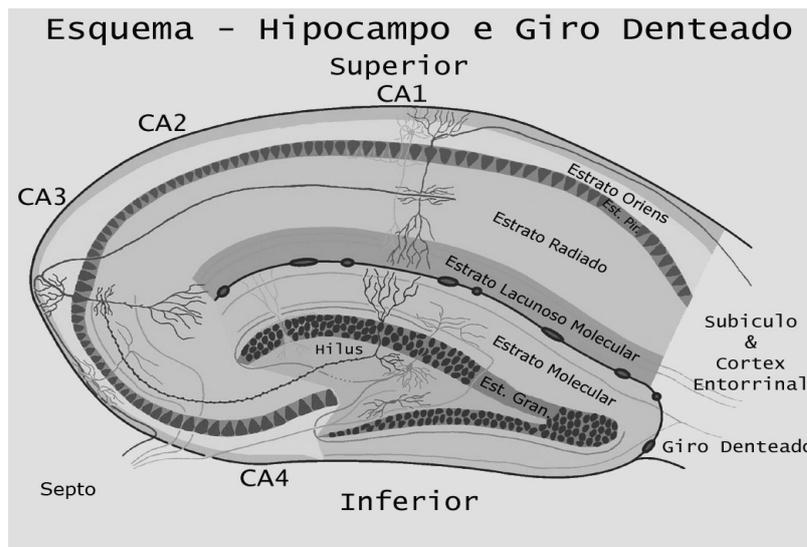


Figura 2: Desenho esquemático do hipocampo demonstrando sua laminação e o circuito tri-sináptico básico do hipocampo.
Fonte: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html

O hipocampo tem sido subdividido anatômica e funcionalmente. Quanto à sua anatomia, o hipocampo é dividido em Corno de Amon (CA) 1, 2, 3 e 4 e região superior e inferior (Figura 2) (BROWN et al., 2003) ou região septal (dorsal) e região temporal (ventral) (BLACKSTAD, 1956; VAN GROEN et al., 2003). CA1 e CA3 formam o hipocampo propriamente dito, e como CA2 é pequeno e indistinto em algumas espécies, ele é freqüentemente incluído em CA1 nas análises. O giro denteado (GD), o subiculum, o córtex entorrinal e CA4 são incluídos no termo “formação hipocampal”, e a área entre o GD e o *stratum granulosum* de CA3 é chamada de polimórfica ou região hilar ou simplesmente *hilus* (BROWN et al., 2003). O hipocampo apresenta fundamentalmente três camadas, a camada polimórfica (*stratum oriens*), a camada piramidal (*stratum pyramidale*) e a camada molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*). O GD consiste em camada polimórfica (*hilus*), camada granular (*stratum granulosum*) e a camada molecular (*stratum moleculare*) que é continua com o hipocampo (BROWN et al., 2003).

Viroses neurotrópicas podem usar o sistema olfatório como uma rota para a invasão do SNC de mamíferos, sendo essa a via utilizada pelo *Herpes simplex virus 1* (ESIRI e TOMLINSON, 1984), *Mouse hepatitis virus* (BARNETT e PERLMAN, 1993), pseudorabdovírus (BABIC et al., 1994), *Venezuelan equine encephalitis virus* (CHARLES et al., 1995), a cepa CVS (*Challenge virus standard*) do vírus da raiva (LAFAY et al., 1991) e dos vírus estudados neste trabalho, Itacaiunas e Curionópolis (DINIZ et al., 2008).

A estratégia utilizada pelo vírus para entrar no SNC pode ser tanto por via intraneuronal como por via hematogênica. Na cavidade nasal, esses rbdovírus afetam, primeiramente, o epitélio respiratório, e de lá se propagam para outras regiões do SNC por três diferentes rotas neuronais incluindo, a via olfatória, a via trigeminal e o sistema nervoso autônomo, ou ainda através da via hematogênica (BABIC et al., 1994). A infecção por via olfatória é seguida por neuroinvasão das áreas temporal, parietal, frontal e outras áreas límbicas (LUNDH et al., 1987; FORGER et al., 1991; HUNEYCUTT et al., 1994; DINIZ et al., 2008).

Estudos de arbovírus a partir de infecções experimentais em animais de laboratório e/ou cultivos celulares têm permitido a identificação do tropismo viral por diferentes tecidos de animais, avaliação das interações vírus-célula e a criação de modelos de infecção que possam servir de comparação com infecções humanas. Dentre os modelos biológicos utilizados para o estudo de arbovírus, camundongos albinos suíços, ainda hoje, representam o melhor sistema para isolamento e pesquisa de arbovírus.

Este trabalho, envolvendo os rbdovírus Itacaiunas e Curionópolis e a resposta das células residentes do SNC do hospedeiro, irá contribuir para melhor entendimento da neuropatologia induzida por essa categoria de vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar aspectos da resposta imune de células residentes do SNC de camundongos albinos, *in vivo* e *in vitro*, após infecção experimental induzida pelos vírus Itacaiunas e Curionópolis.

2.2 ESPECÍFICOS

- a. analisar, qualitativa e quantitativamente, as alterações do número de astrócitos e de microglia ativadas na região hipocampal possivelmente induzidas pela infecção viral;
- b. quantificar a expressão de citocinas na infecção causada pelos vírus Itacaiunas e Curionópolis em culturas primárias de células do SNC;
- c. analisar a expressão de óxido nítrico na infecção pelos vírus Itacaiunas e Curionópolis em culturas primárias de células do SNC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais (CEPAN) do Instituto Evandro Chagas (parecer de aprovação – Anexo A), e todos os procedimentos foram executados observando-se as normas e critérios pré-estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança, para a execução de procedimentos de isolamento e técnicas destinadas à utilização de agentes infecciosos pertencentes ao nível de biossegurança 2.

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.

3.2 CEPAS VIRAIS

Amostras dos vírus Itacaiunas (AR 427036) e Curionopolis (AR 440009) foram fornecidas pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SEARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) neonatos mantidos pelo Biotério Central do IEC. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, alimentados com ração peletizada, água *ad libitum* e observados diariamente.

3.4 PROCESSAMENTO HISTOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO

Camundongos neonatos (2 dias) foram distribuídos em dois grupos: 1) **grupo controle**, que recebeu por via intra-nasal (i.n.) 0,01mL de uma suspensão de cérebro de camundongos não infectados; 2) **grupo infectado**, cujos animais foram inoculados por via i.n. com 0,01mL de suspensão de cérebro de camundongos infectados. As suspensões de cérebros infectados e não infectados foram feitas a partir da maceração de cérebro de camundongo na proporção de 1:2, em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,2), contendo 0,75% de albumina bovina (BSA), estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100UI/mL) (v/v). Ao longo da infecção, dez animais do grupo controle e dez animais dos grupos infectados (5 animais em cada janela temporal) foram anestesiados com avertina 0,5mL/5g de peso corporal para posterior perfusão. Este procedimento foi realizado no 2º e 5º dia para o grupo inoculado com o vírus Curionopolis, e no 4º e 7º dia para o grupo inoculado com o vírus Itacaiunas.

3.4.1 Fixação por perfusão

Os animais foram fixados por perfusão pela via intracardíaca (ventrículo esquerdo), com solução salina contendo 0,9% de cloreto de sódio e 1000 U.I./L de heparina (pH 7,2) à 37°C, seguida de solução fixadora contendo 4% de paraformaldeído e 5% de sacarose em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) à 37°C. Após perfusão, a calota craniana foi aberta para a retirada do encéfalo que foi imerso na mesma solução fixadora por 24 horas. Ao final desse procedimento, o cérebro foi examinado macroscopicamente e processado para a obtenção de cortes no plano axial a 70µm de espessura em micrótomo de lâmina vibratória (Micron HM650V), para realização de técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas.

3.4.2 Processamento histoquímico para detecção de microglias ativadas

Para identificação de células microgлияis ativadas com fenótipo amebóide em cérebros de camundongos neonatos, foi utilizada a lectina *Lycopersicum esculentum*,

que possui alta afinidade pelo açúcar poli-N-acetil-lactosamina presente na superfície de microglias ativadas (ACARIN et al., 1994; ZHU e LAINE, 1989).

Os cortes foram colocados por 20 minutos em uma solução de metanol com 1% de peróxido de hidrogênio. Após lavagem com PBS-Tween 20 5% (PBS-T 5%), os cortes foram incubados em PBS contendo a lectina *Lycopersicon esculentum* biotinilada (6µg/mL), por no mínimo 12 horas à temperatura ambiente (T.A.). Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e colocados por uma hora em solução contendo estreptavidina complexada com peroxidase. Depois de uma hora, os cortes foram lavados com tampão fosfato 0,1M e a reação revelada com o Kit *VECTOR VIP*, segundo instruções do fabricante. Em seguida, os cortes foram desidratados em etanol, contra-corados com Cresil Violeta a 0,5%, montados entre lâmina/lamínula com Entellan e analisados em microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha) e fotografados com câmera digital AxioCan (Zeiss, Alemanha).

3.4.3 Processamento imunohistoquímico para detecção de astrócitos

Para a detecção de astrócitos, foi utilizado o anticorpo anti-GFAP, através da técnica de imunoperoxidase usando o Kit comercial *Vector Mouse on Mouse Basic Kit* (KIT M.O.M.), seguindo instruções do fabricante, com adaptações.

Os cortes histológicos foram previamente lavados em tampão fosfato 0,1M e incubados em ácido bórico 0,2M (pH 9,0) a 70°C por uma hora para recuperação dos sítios antigênicos. Em seguida, os cortes foram lavados e permeabilizados com solução PBS-Tween 20 0,5% (pH 7,7) quatro vezes de 5 minutos cada, à T. A. Entre cada uma das etapas descritas a seguir houve lavagens dos cortes usando PBS-TWEEN 20 0,5%. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado por imersão dos cortes em solução de metanol com 1% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. O bloqueio contra reação inespecífica foi feito com uma solução de PBS contendo 5% de BSA e 10% de soro normal de cabra (pH 7,2) por uma hora, seguido de bloqueio com o componente *IgG Blocking Reagent* do Kit M.O.M.TM por uma hora à temperatura ambiente. Após esse tempo, os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-GFAP (1:800) por 72 horas, à T.A. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (*M.O.M. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent*) por uma hora, seguido por incubação com o reagente ABC (Vectastain®) por uma

hora, de acordo com as instruções do kit. Após lavagem, os cortes foram incubados em tampão acetato 0,2M (pH 6,0) por 5 minutos e a reação foi revelada com a solução de GND (*3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate* 0,6mg/mL, cloreto de níquel 2,5 mg/mL e glucose oxidase). Para interromper a reação, foi utilizado o tampão fosfato 0,1M. Em seguida, os cortes foram desidratados em etanol, contra-corados com Cresil Violeta 0,5%, montados entre lâmina/lamínula com Entellan e analisados em microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha) e fotografados com câmera digital AxioCan (Zeiss, Alemanha).

3.5 ESTEREOLOGIA

A palavra estereologia foi escolhida para descrever um conjunto de métodos que promovem uma interpretação tridimensional de estruturas baseada na observação feita em seções dimensionais (SCHMITZ e HOF, 2000). A estereologia baseia-se em processos de amostras sistêmicas que são independentes das propriedades do tecido (GLASER e GLASER, 2000).

Os métodos estereológicos foram desenvolvidos desde 1984 e tem sido largamente utilizados para quantificação de neurônios em subregiões do sistema nervoso central (BONTHIUS et al., 2004), permitindo estimativas precisas e eficientes de parâmetros quantitativos de estruturas biológicas, assim como do número de células de uma região específica do cérebro (LONG et al., 1998).

Em resumo, o processo inteiro foi realizado em duas etapas: 1) Amostragem: acesso à estrutura inteira garantindo que todas as regiões de interesse tiveram chances similares de contribuição para a amostra, assim como, de que os objetos de interesse puderam ser reconhecidos sem ambiguidade; 2) Medidas: as coletas de dados para contagem dos objetos de interesse foram realizadas através do programa *StereolInvestigator* (MicroBrightField, Williston, VT, USA) integrado a um microscópio óptico Nikon (Japão), com platina motorizada para os eixos X, Y e Z e microcomputador, onde os dados das coordenadas tridimensionais foram registrados e o controle da platina e a execução do programa foi realizado.

Em seções coradas por histoquímica para *Lycopersicum esculentum* e por imunohistoquímica para GFAP, as regiões de CA3 e da fissura hipocampal,

respectivamente, foram delimitadas utilizando objetiva de 3.2x do microscópio óptico. Para detecção dos objetos de interesse foi utilizada a objetiva de 60x.

Após delimitação da área de interesse, uma matriz de contagem previamente determinada é sobreposta à área estudada e blocos de contagem são automaticamente inseridos, espaçados igualmente nas interseções da matriz (Figura 3). Para isso, o experimentador alimenta o programa definindo as dimensões do bloco, da matriz de contagem e da fração amostral de secções. A escolha dessas dimensões e da fração amostral foi feita em ensaio preliminar (por tentativa e erro) até que o coeficiente de erro de uma fatia individual fosse adequado para obter resultados médios para o conjunto de secções com baixo coeficiente de erro ($p < 0.05$).

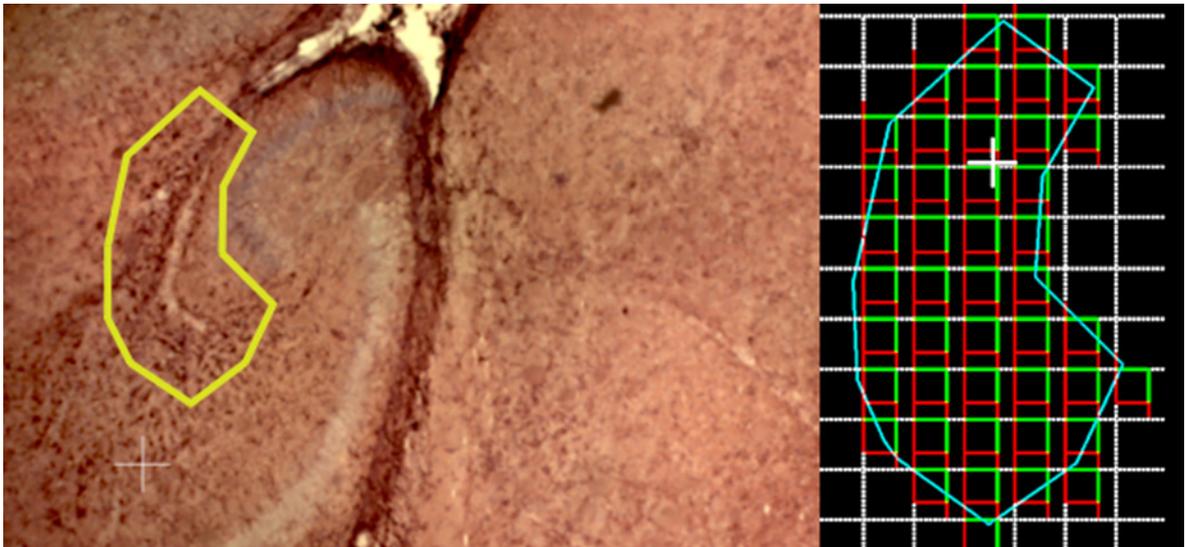


Figura 3: Ilustração da região da fissura hipocampal delimitada e geração da matriz e blocos de contagem com o auxílio do programa Stereoinvestigator em secções de cérebros coradas por imuno-histoquímica para detecção de GFAP.

Em cada bloco de contagem foram marcados os objetos de interesse (astrócitos e microglias ativadas), os quais geraram informações para o programa acerca do número e da posição dos elementos contidos em cada bloco. A partir dessas informações, colhidas sistematicamente na fração de secções eleitas para contagem, o programa estimou o número esperado de objetos de interesse na estrutura inteira. Foi tomado cuidado especial para evitar contagens repetidas do mesmo objeto nos diferentes planos de foco. Para isso, repetiu-se o procedimento de focalização ao topo e à base da secção nos diferentes planos ao longo do eixo Z

mais de uma vez em cada bloco, particularmente quando co-existam muitos elementos no mesmo bloco.

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

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

Onde:

N – número total de objetos

ΣQ – número de objetos contados

ssf – *section sampling fraction* = secções contadas/total de secções

asf – *area sampling fraction* = área da caixa/área matriz

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

Esses valores dependem: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contem a região de interesse - *section sampling fraction*; 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem - *area sampling fraction*; e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos - *thickness sampling fraction* (HOWARD e REED, 2005).

3.6 ESTATÍSTICA

Para analisar o ensaio estereológico empregando o fracionador óptico é preciso levar em consideração que, por razões metodológicas, não se pode contar o número total de células existentes numa dada região do encéfalo, muito menos no cérebro como um todo. Assim, o máximo que se pode pretender é realizar estimativas que se aproximem ao máximo do que seria esperado (CRUZ-ORIVE, 1994; SCHMITZ, 1998).

Para contornar o problema da impossibilidade de calcular o erro verdadeiro em experimentação biológica, por não se poder contar todos os objetos de interesse, foi feita uma avaliação computacional simulando grandes quantidades

amostrais (SCHMITZ e HOF, 2000). Esse estudo demonstrou que as estimativas do número total de objetos de interesse, obtidas a partir do fracionador óptico, são do ponto de vista estatístico e do ponto de vista do esforço empreendido, mais eficientes do que as estimativas a partir da densidade e volume (SCHMITZ e HOF, 2000).

Além disso, várias maneiras de se estimar o erro foram testadas em amostras simuladas por computador, em busca de um modo de calcular o coeficiente de erro que se aproximasse o máximo possível do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (GLASER e WILSON, 1998). Assim, no presente trabalho deu-se preferência ao fracionador óptico como método estereológico e ao coeficiente de Scheaffer como instrumento de medida do erro. Utilizando esse coeficiente, definiu-se que as dimensões da matriz e dos blocos de contagem seriam adequadas quando o coeficiente de Scheaffer fosse menor do que 0,05.

Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total ($CE^2/CV^2 < 0,5$, onde CE: coeficiente de erro e CV: Desvio Padrão/Média). No presente trabalho a relação CE^2/CV^2 esteve sempre abaixo de 0,5, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens.

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

A análise estatística dos resultados obtidos do programa Stereoinvestigator foi feita através do programa BioEstat 5.0, utilizando o teste *t* para estabelecer diferenças entre os grupos ($p < 0.05$).

3.7 CULTURAS PRIMÁRIAS

3.7.1 Cultura mista de células gliais

Culturas mistas de células gliais foram preparadas como descrito por Moura Neto e colaboradores (1983). Camundongos albinos suíços neonatos (2 a 3 dias) foram anestesiados por hipotermia e sacrificados. Após assepsia em etanol 70%, os cérebros foram retirados e colocados em placas de Petri contendo PBS adicionado de D-glicose a 0,6%. Os cérebros foram dissecados, meninges e vasos removidos sob ambiente estéril. As células foram dissociadas mecanicamente em PBS, utilizando pipetas de vidro. Após decantação do tecido não dissociado por 3 a 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos de 15mL, centrifugado a 300g por 5 minutos e o sedimento ressuspensionado em meio glial [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12), D-glicose (0,6%), L-glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3mM), penicilina/estreptomicina (0,5mg/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB)]. Uma pequena alíquota da suspensão de células foi adicionada em azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer. As células foram semeadas na densidade aproximada de 2×10^6 células em frascos de cultura de 75cm^2 . As células foram mantidas em incubadora à 37°C, sob atmosfera úmida composta de 95% de ar atmosférico e 5% de CO_2 .

3.7.2 Cultura enriquecida de neurônios

Culturas de neurônios embrionários foram preparadas como previamente descrito por Brewer (1995). Camundongos fêmeas, na 3ª semana de gestação (16-18 dias), foram sacrificadas em câmara de CO_2 . O útero com os fetos foi extraído sob condições estéreis e colocado em uma placa de Petri com solução balanceada de Hanks' (HBSS), suplementada com piruvato de sódio (1mM) e tampão HEPES (10mM), à T.A. Os embriões foram retirados, os cérebros dissecados, meninges e vasos removidos. As células foram dissociadas mecanicamente em tubo de 15mL contendo HBSS, usando pipetas de vidro. Após permitir a decantação dos fragmentos de tecido não dissociados por 3 a 5 minutos, o sobrenadante foi transferido e centrifugado em tubos de 15mL por 5 minutos a 300g. O sedimento foi

ressuspendido em meio Neurobasal suplementado com Glutamax 0,5mL, glutamato 25 μ M e suplemento B27 (2mL de B27 50X concentrado). Uma alíquota de células foi adicionada em azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer. As células foram semeadas sobre lamínulas de vidro redondas em placas de 24 poços na concentração de aproximadamente 1×10^6 células/poço. As células foram mantidas em incubadora à temperatura de 37°C, sob atmosfera úmida composta de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂.

3.7.3 Co-cultura enriquecida de astrócitos/neurônios

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas como descrito previamente por McCarthy e De Vellis (1980). Frascos de cultura contendo células gliais confluentes (10 a 14 dias) foram cuidadosamente lavados e depois agitados manualmente. Após agitação, o sobrenadante, contendo basicamente oligodendrócitos e microglias foi removido e o meio de cultura repostado sobre a monocamada contendo predominantemente astrócitos. As culturas de astrócitos aderidas nos frascos foram submetidas à dissociação enzimática por tripsina-EDTA (0,25%) e semeadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços na concentração de aproximadamente 5×10^5 células/poço em meio glial. Após atingir a confluência, foram semeados neurônios embrionários na concentração de 1×10^6 células/poço em meio Neurobasal. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, sob atmosfera úmida composta de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂.

3.7.4 Co-cultura enriquecida de microglias/neurônios

Microglias foram obtidas como descrito por Lima e colaboradores (2001), com algumas modificações. Células microgliais foram isoladas a partir de culturas de células gliais confluentes, sendo identificadas morfológicamente como células brilhantes localizadas sobre a monocamada. As microglias foram soltas mediante agitação manual durante alguns minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 300g por 5 minutos. As células foram ressuspendidas e semeadas sobre culturas de neurônios com 3 dias de semeadura e mantidas em meio glial. As

células foram mantidas em incubadora a 37°C, sob atmosfera úmida composta de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂.

Todas as lamínulas e frascos utilizados nos cultivos primários foram previamente tratados com uma solução de poli-L-ornitina (Peso Molecular: 30.000–70.000) na concentração de 6,25µg/mL (0,16mL/cm² área de superfície).

3.7.5 Inoculação dos vírus em culturas primárias

A inoculação dos vírus foi feita em placas de 24 poços contendo as culturas primárias de células do SNC. Suspensão de cérebro de camundongos infectados com os vírus foi esterilizada em filtros de 0,22µm e adicionada às culturas (proporção 1:10) e observadas diariamente ao microscópio óptico invertido (Axiovert S100 – Zeiss, Alemanha) para verificar a ocorrência de efeito citopático (ECP). As culturas controle negativo foram inoculadas com suspensão de cérebros não-infectados.

3.8 IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

A técnica foi executada segundo Gubler e colaboradores (1984) com algumas modificações. Foi realizada para detecção de antígenos virais, utilizando o soro homólogo de cada vírus em neurônios, e para caracterização dos cultivos de neurônios e astrócitos, utilizando anticorpos anti-neurofilamento e anti-GFAP, respectivamente, proteínas do citoesqueleto típico dessas células. Para microglia foi utilizado isolectina B4 conjugada com isotiocianato de fluoresceína, que identifica o açúcar α-D-galactose na superfície dessa célula.

As células crescidas em lamínula foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Após fixação, as amostras foram lavadas com PBS (pH 7,2) e permeabilizadas em solução de Triton X-100 a 2% em PBS. Em seguida, foi feita a incubação das amostras em cloreto de amônio 50mM em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com solução contendo 1% de BSA em PBS. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anticorpo primário diluído em solução de PBS contendo 1% de BSA por 12-18h a

4°C. Após lavagem, as células foram incubadas com anticorpo secundário complexado com fluorocromo. As lamínulas foram então lavadas em PBS e em água destilada, montadas em n-propilgalato e finalmente observadas ao microscópio de fluorescência (Axiophot, Zeiss, Alemanha).

3.9 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Esta técnica foi realizada conforme instrução do fabricante do Kit (BD OptEIA™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

Após inoculação dos vírus em cultivos celulares, sobrenadantes foram coletados nos tempos de 48 e 96 horas pós-inoculação para análise da expressão das citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β .

Placas específicas para esta técnica (com 96 poços) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para cada citocina, obedecendo a uma curva de diluições previstas no kit, em tampão apropriado e incubadas por um período de tempo e temperatura indicados. As placas sensibilizadas foram lavadas com uma solução de PBS contendo Tween 20 0,05% e depois incubadas em solução de bloqueio contendo PBS e 10% de SFB por uma hora à temperatura ambiente. Decorrida esta etapa, as microplacas foram novamente lavadas, seguida da adição dos sobrenadantes dos cultivos e incubação por duas horas a temperatura ambiente. Após este intervalo, as microplacas foram lavadas e incubadas com anticorpo de detecção conjugado com biotina, por uma hora à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Novo ciclo de lavagem foi realizado antes da incubação com avidina ligada à peroxidase por uma hora à temperatura ambiente. A seguir as placas foram lavadas e, posteriormente, incubadas com o cromógeno (que acompanha o Kit) por 30 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Após incubação, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N. A análise da reação foi realizada em leitor de ELISA (Modelo EI 800 – Bio-Tek), sob comprimento de onda 450nm.

Os resultados foram analisados pelo software *Graphpad prism 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando o teste ANOVA: um critério, pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

3.10 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Foi utilizado o indicador de óxido nítrico, DAF-FM diacetato (*4-amino-5-methylamino-2,7'-difluorofluorescein diacetate*), para a detecção desta molécula na interação de células do SNC com os vírus Itacaiunas e Curionopolis. Os experimentos de detecção de ON foram realizados após 48 e 96 horas de infecção. Em cada intervalo, as células vivas cultivadas em lamínulas foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 (pH 7,2) livre de vermelho de fenol. A seguir, foram adicionadas às culturas meio RPMI 1640 (pH 7,2) nas mesmas condições, suplementado com SFB 2% e o DAF-FM na concentração final de 5 μ M. As culturas foram incubadas a 37° C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante uma hora. Decorrido este tempo, as células foram lavadas novamente duas vezes com meio RPMI 1640 e incubadas com o mesmo meio durante 15 minutos para permitir a completa de-esterificação do diacetato intracelular. O meio com resíduos deste produto foi substituído por outro e as células foram lavadas mais duas vezes. A observação foi realizada após montagem da lamínula sobre uma gota de meio RPMI sobre lâmina de microscopia para análise em microscópio de fluorescência (Axioskop 40, Zeiss, Alemanha) (comprimento de onda de 520nm).

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE MICROGLIAS ATIVADAS

Os animais controles com 2, 4, 5, e 7 dias pós-inoculação (d.p.i.) não apresentaram marcação de microglias ativadas, havendo, somente, marcação de células endoteliais do parênquima cerebral.

Secções de cérebro de camundongos infectados com o vírus Curionopolis 2d.p.i. e Itacaiunas 4 e 7d.p.i. também não apresentaram marcação de microglias ativadas, exceto pequena marcação nas regiões de substância branca e na fissura hipocampal. Entretanto, marcação de microglias ativadas foi encontrada em secções de cérebros de camundongos 5d.p.i com o vírus Curionopolis (Figura 4), principalmente nas regiões de córtex, hipocampo e tálamo.

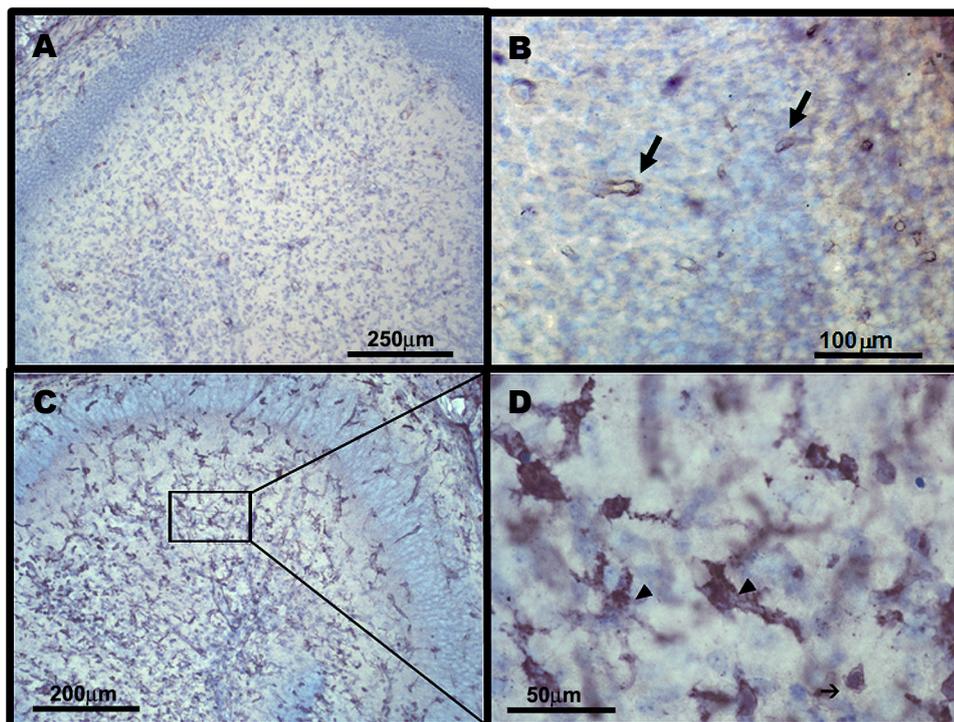


Figura 4: Micrografias de secções de cérebros de camundongos dos grupos controle (A-B) e infectados com o vírus Curionopolis 5d.p.i. (C-D), processados por histoquímica para marcação de microglias ativadas, evidenciando a região do hipocampo. **A** – Grupo controle 5d.p.i.; **B** – Grupo controle em maior aumento, evidenciando vasos marcados (setas) e ausência de marcação de microglias ativadas. **C** - Marcação evidente de microglias ativadas no grupo infectado com Curionopolis 5d.p.i.; **D** – Maior aumento de C, mostrando microglias ativadas na região CA3 (setas).

O hipocampo, mais especificamente a região CA3, foi a região escolhida para a contagem de microglias, devido ser uma região altamente afetada pelos vírus (DINIZ et al., 2008) e, além disso, ser anatomicamente bem definida. Somente animais infectados com o vírus Curionópolis 5d.p.i. mostraram quantidade média significativa de microglias ativadas em relação ao controle (média: 5665,6; CE: 0,08). Na Tabela 1 encontram-se os resultados estereológicos e coeficiente de variação biológica (CVB) do grupo analisado. O grupo apresentou CVB maior que 50%, indicando que o método estereológico aplicado foi preciso (os parâmetros estereológicos utilizados para contagem de microglias ativadas encontram-se no anexo B).

Tabela 1 - Estimativa estereológica de microglias ativadas na região de CA3 do hipocampo do grupo de animais infectados com Curionópolis 5d.p.i.

ANIMAIS	N	ESPESSURA DA SECCÃO (μm)	CE
A1	6058	9,6 \pm 0,2	0,07
A2	3790	11 \pm 0,4	0,08
A3	5986	13,2 \pm 0,2	0,09
A4	8090	14,2 \pm 0,2	0,08
A5	4404	12,7 \pm 0,3	0,1
Média	5665,6	11,8 \pm 0,09	0,08
DP	1677		
CV ² (DP/Média ²)	0,09		
CE ²	0,01		
CE ² /CV ²	0,08		
CVB ²	0,08		
CVB ² (%CV ²)	91,95		

Coeficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE). $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CV: coeficiente de variação; CVB: coeficiente de variação biológica).

Os camundongos infectados com o vírus Itacaiunas 7d.p.i. não apresentaram marcação significativa de microglias ativadas para que pudessem ser analisada estatisticamente. Notou-se nas secções de cérebro de camundongos infectados com o vírus Itacaiunas marcações discretas nas regiões de substância branca e um pouco mais intensa no cerebelo, além de grande quantidade de núcleos picnóticos corados pelo cresil violeta (dados não mostrados).

4.2 DETECÇÃO DE ASTRÓCITOS

A imunohistoquímica para detecção de GFAP revelou marcação discreta de astrócitos, tanto em animais do grupo controle 2, 4, 5, e 7d.p.i., quanto em animais dos grupos infectados com os vírus Curionópolis 2d.p.i e Itacaiunas 4 e 7d.p.i. no hipocampo. Além disso, nesses tempos iniciais da infecção com os vírus, verificou-se pequena marcação no bulbo olfatório. Por outro lado, nos camundongos infectados com Curionópolis 5d.p.i., a marcação foi observada em regiões do bulbo olfatório, córtex frontal, temporal e parietal, tálamo, gânglios da base e hipocampo. Porém, as marcações de astrócitos no hipocampo se concentraram mais na região da fissura hipocampal (Figura 5), o que justificou sua escolha para a quantificação celular, mostrando diferença significativa entre o grupo controle e o infectado com Curionópolis 5d.p.i (Figura 6). Na tabela 2 estão os resultados estereológicos das médias dos animais de cada grupo (controle e infectado 5d.p.i.) (os parâmetros estereológicos utilizados para contagem de astrócitos encontram-se no anexo C).

Os camundongos infectados com Itacaiunas 7d.p.i. mostraram astrócitos reativos evidentes e mais concentrados na região do cerebelo quando comparados com os seus controles (dados não ilustrados).

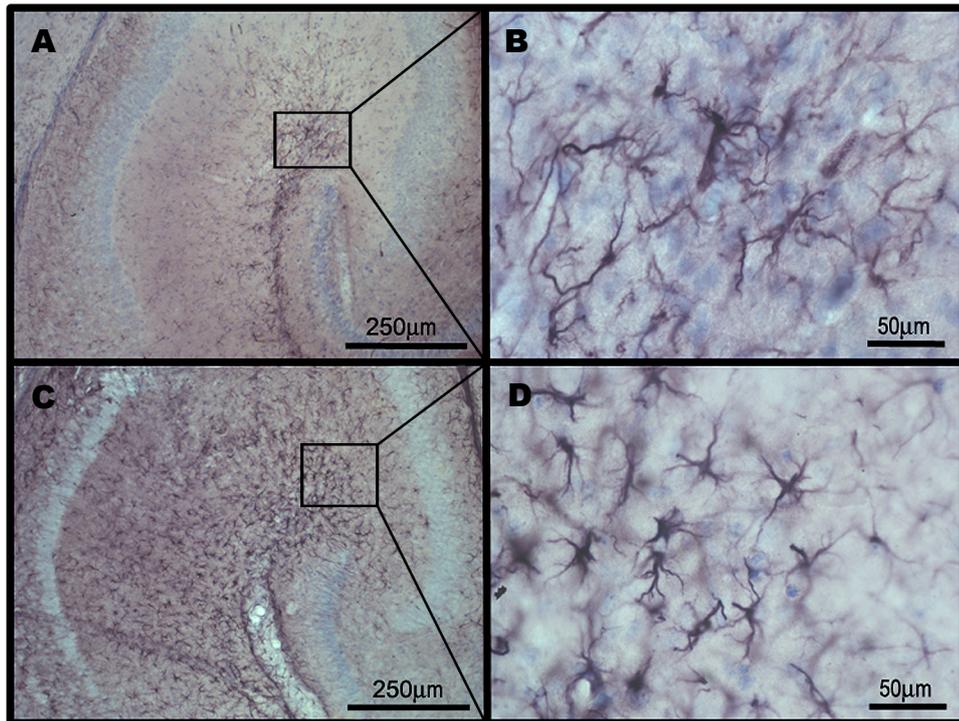


Figura 5: Micrografias de secções de cérebros de camundongos dos grupos controle (A-B) e infectados com o vírus Curionopolis 5d.p.i. (C-D), processados por imunohistoquímica para marcação de GFAP, evidenciando região do hipocampo. **A** – Grupo controle 5d.p.i.; **B** – Grupo controle em maior aumento; **C** - Marcação bem evidente de astrócitos no grupo infectado com Curionopolis 5d.p.i.; **D** – Maior aumento de C, mostrando astrócitos marcados na fissura hipocampal.

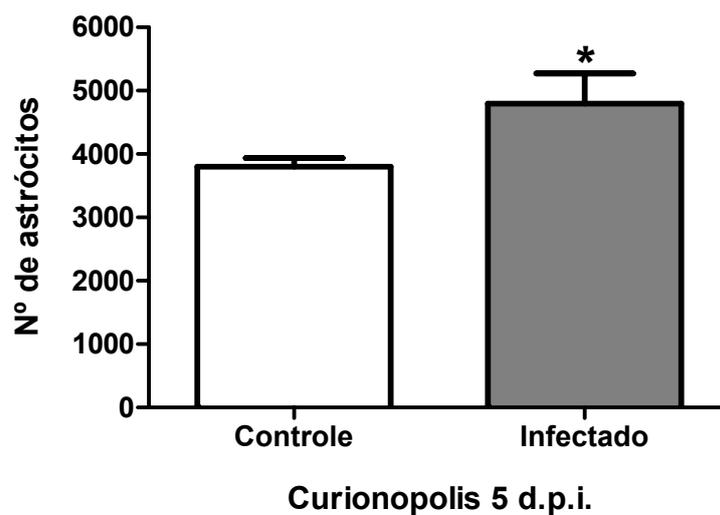


Figura 6: Representação gráfica do número estimado de astrócitos, através do fracionador óptico na fissura hipocampal. O grupo infectado com Curionopolis 5d.p.i. mostrou números significativamente (*) maiores do que o grupo controle (Teste *t*, $p < 0.05$).

Tabela 2 - Estimativa estereológica de astrócitos na região da fissura hipocampal dos grupos de animais controles e animais infectados com Curionopolis 5d.p.i.

ANIMAIS CONTROLE	N	ESPESSURA DA SEÇÃO (μm)	CE	ANIMAIS INFECTADOS	N	ESPESSURA DA SEÇÃO (μm)	CE
A1	3143	11,4 \pm 0,02	0,06	A1	6080	12,6 \pm 0,05	0,05
A2	3911	13,6 \pm 0,07	0,06	A2	3955	14,2 \pm 0,02	0,06
A3	3955	14,2 \pm 0,02	0,06	A3	3724	13,2 \pm 0,06	0,06
A4	3786	13,2 \pm 0,08	0,06	A4	3551	12,8 \pm 0,06	0,07
A5	4005	13,2 \pm 0,10	0,07	A5	5559	12,8 \pm 0,06	0,05
				A6	5905	12,2 \pm 0,05	0,05
Média	3760	13,12 \pm 0,47	0,062	Média	4795,67	13 \pm 0,28	0,06
DP	354,34			D.P.	1171,93		
CV ² (DP/Média ²)	0,01			CV ² (D.P./Média ²)	0,06		
CE ²	0,00			CE ²	0,00		
CE ² /CV ²	0,43			CE ² /CV ²	0,05		
CVB ²	0,01			CVB ²	0,06		
CVB ² (%CV ²)	56,72			CVB ² (%CV ²)	94,62		

Coefficiente de variação biológica, calculado a partir da média absoluta do grupo, desvio padrão (D.P.) e média do coeficiente de erro (CE). $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CV: coeficiente de variação; CVB: coeficiente de variação biológica).

4.3 IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

Nos experimentos realizados para marcação de antígenos virais foram observadas marcações citoplasmáticas para antígenos virais de Itacaiunas (Figura 7a) e Curionopolis (Figura 7b) em cultivos primários de neurônios 3d.p.i.

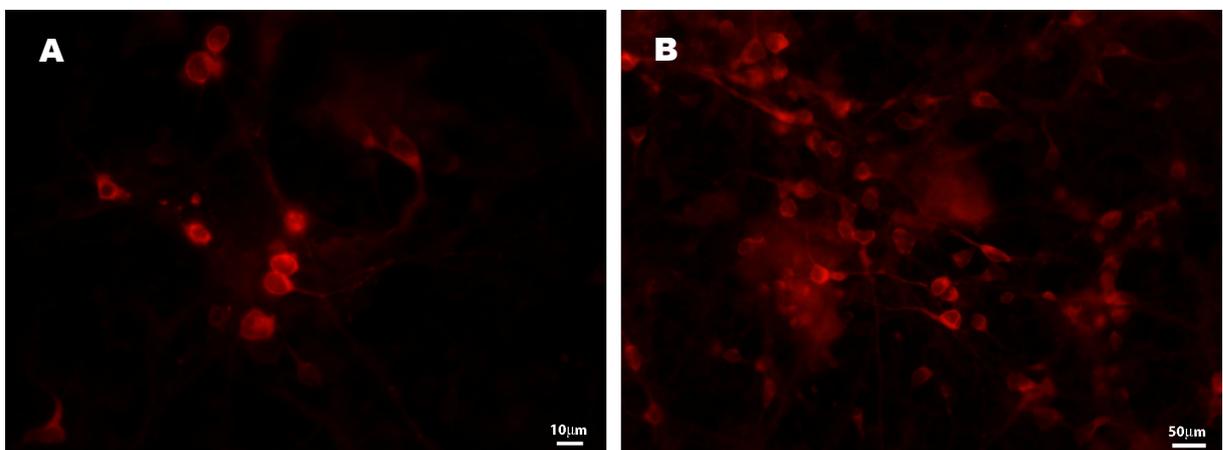


Figura 7: Micrografia de fluorescência mostrando a marcação de antígenos virais em neurônios 3d.p.i.. (A) Marcação de antígenos virais de Itacaiunas e (B) antígenos virais de Curionopolis.

Para identificação celular, utilizamos anticorpos contra proteínas marcadoras específicas de cada tipo celular: neurônios (Figura 8a e b), co-cultura de astrócitos/neurônios (Figura 8c) e co-cultura de microglias/neurônios (Figura 8d).

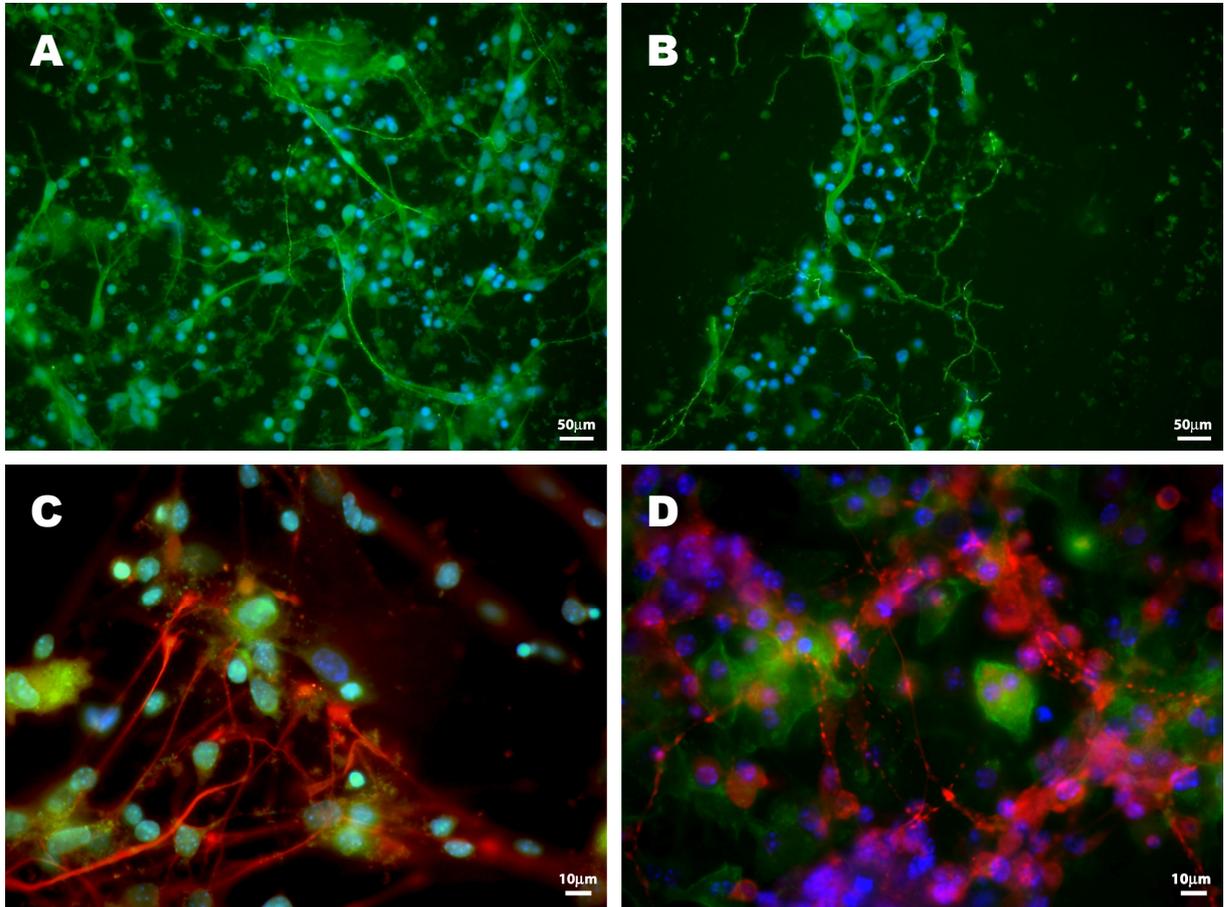


Figura 8: Fotomicrografias de fluorescência mostrando proteínas marcadoras celulares. (A e B) imunomarcagem de neurofilamentos (verde) em neurônios e núcleos celulares corados pelo Hoechst 33258 (azul). (C) Imunomarcagem de GFAP (vermelho) em astrócitos, de neurofilamentos (verde) em neurônios e núcleos celulares corados pelo Hoechst 33258 (azul). (D) Imunomarcagem de neurofilamentos (vermelho) em neurônios, isolectina B4 (verde) em microglias e núcleos celulares corados pelo Hoechst 33258 (azul).

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-12p40, TNF- α e IFN- γ e anti-inflamatórias IL-10, IL-4 e TGF- β foram realizados a partir de sobrenadantes de co-culturas de células do SNC: 1) astrócitos/neurônios; e 2) microglias/neurônios, infectados com os vírus Itacaiunas e Curionópolis, coletados 48 e 96 horas pós-inoculação (h.p.i.).

A análise da expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-4 mostrou níveis abaixo de 10pg/mL, além de não apresentar diferença entre os cultivos controle (CTL) e infectados (INF), nos tempos avaliados.

Em amostras provenientes de sobrenadantes das culturas controle e infectadas com o vírus Itacaiunas 48 e 96h.p.i., detectaram-se níveis acima de 100pg/mL da citocina IL-12p40. Entretanto, houve diferenças significativas quando se comparou culturas controle e infectadas (Figura 9a).

A quantidade de IL-12p40 produzida nas culturas infectadas com o vírus Itacaiunas foi significativamente maior do que a quantidade produzida nas culturas controle 48h.p.i. Co-culturas enriquecidas de astrócitos/neurônios infectadas produziram quantidade significativamente maior dessa citocina do que co-culturas enriquecidas de microglia/neurônios infectados.

A quantidade de IL-12p40 produzida nas culturas infectadas com o vírus Itacaiunas 96h.p.i. foi significativamente maior do que a quantidade produzida nas culturas controle (Figura 9b). No entanto, não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de culturas infectadas no mesmo tempo. A produção de IL-12p40 não difere significativamente de 48 para 96h.p.i. nas culturas infectadas com o vírus Itacaiunas.

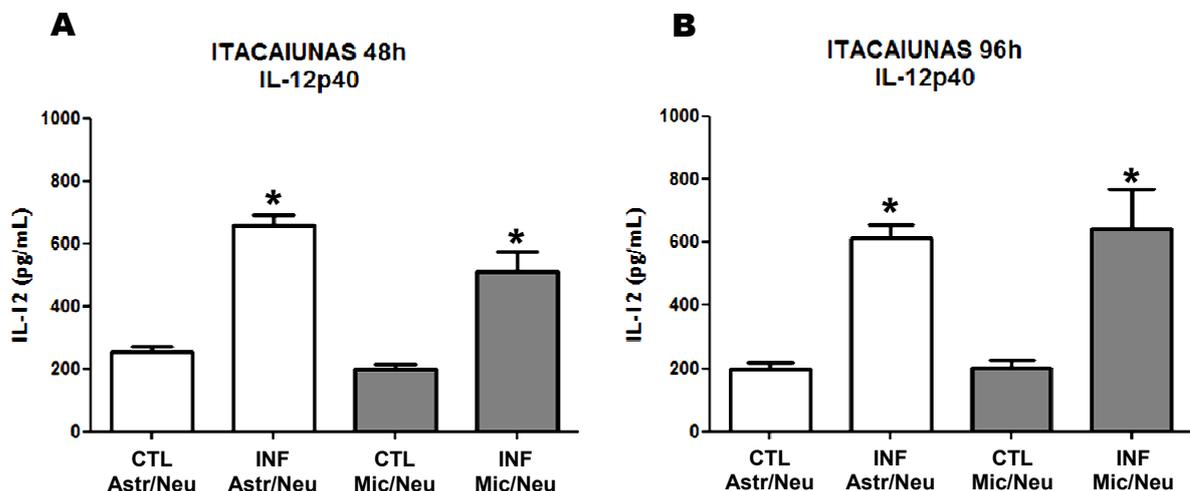


Figura 9: Análise da expressão da citocina IL-12p40 em co-culturas primárias enriquecidas de astrócitos/neurônios (Astr/Neu) e de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com o vírus Itacaiunas 48h.p.i. (A) e 96h.p.i. (B). CTL: controle; INF: infectado; (*) diferença significativa entre grupos controle e infectados (Teste ANOVA: um critério, $p < 0,05$);

Em amostras provenientes de sobrenadantes das culturas controle e infectadas com o vírus Curionópolis 48 e 96h.p.i., também foram detectados níveis

acima de 100pg/mL de IL-12p40. A quantidade de IL-12p40 produzida nas culturas infectadas com o vírus Curionopolis foi significativamente maior do que aquela produzida nos controles, 48 e 96h.p.i. (Figura 10). Não houve diferença significativa na quantidade de IL-12p40 produzida entre diferentes tipos de culturas infectadas com esse vírus nos tempos avaliados. A produção dessa citocina não difere significativamente de 48 para 96h.p.i. nas culturas infectadas com o vírus Curionopolis.

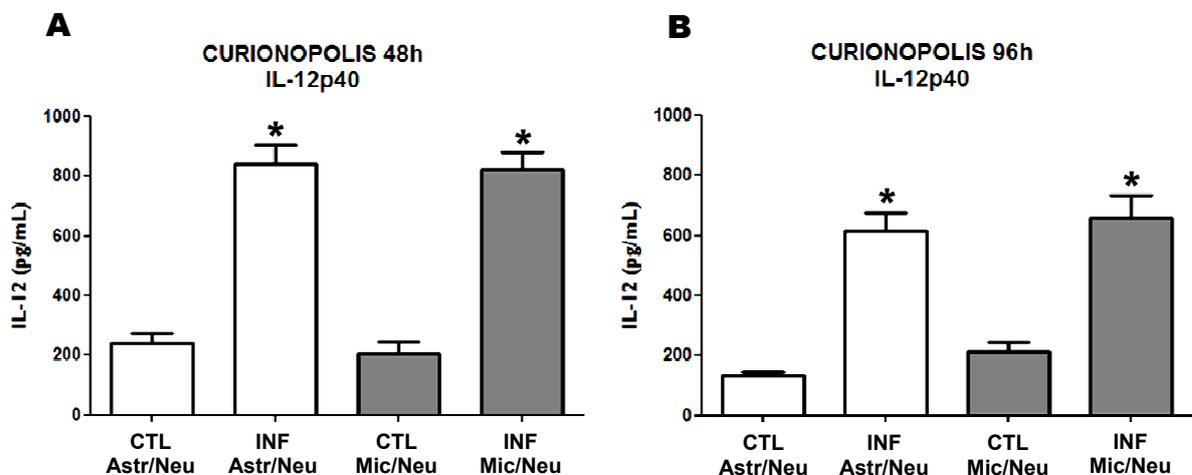


Figura 10: Análise da expressão da citocina IL-12p40 em co-culturas primárias enriquecidas de astrócitos/neurônios (Astr/Neu) e de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com o vírus Curionopolis 48 (A) e 96 h.p.i. (B). CTL: controle; INF: infectado; (*)diferença significativa entre grupos controle e infectados (Teste ANOVA: um critério, $p < 0,05$);

A análise da expressão da citocina IL-10, 48h.p.i., mostrou níveis abaixo de 10pg/mL, além de não apresentar diferença entre as culturas controle e infectadas, tanto com o vírus Itacaiunas quanto com o vírus Curionopolis.

A quantidade de IL-10 produzida nas co-culturas de microglia/neurônios infectadas com os vírus Itacaiunas e Curionopolis (Figura 11) foi significativamente maior do que a produzida nas culturas controles, 96h.p.i. Não houve diferença entre as demais culturas testadas. No entanto, quando se comparou a quantidade de IL-10 produzida nas co-culturas enriquecidas de microglia/neurônios 96h.p.i., verificou-se que nas culturas infectadas com o vírus Itacaiunas a quantidade foi significativamente maior do que naquelas infectadas com o Curionopolis.

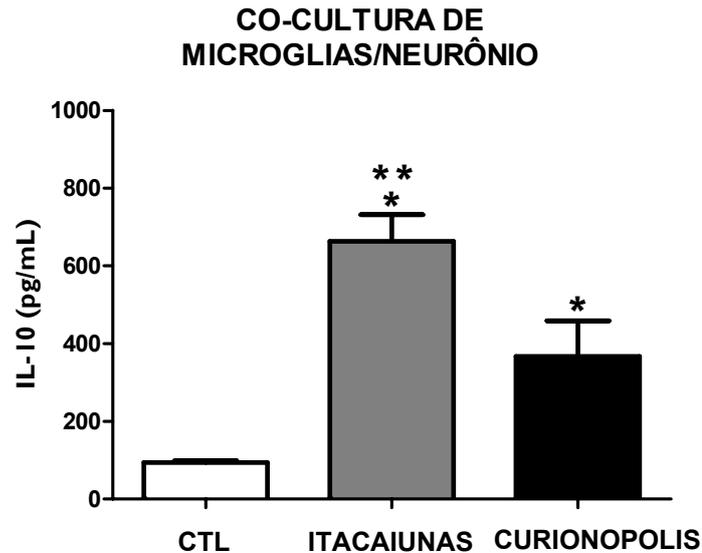


FIGURA 11: Análise da expressão da citocina IL-10 em co-culturas primárias enriquecidas de microglias/neurônios (Mic/Neu) infectadas com os vírus Itacaiunas e Curionopolis 96h.p.i. CTL: controle; (*) diferença significativa entre grupos controle e infectados (**) diferença significativa entre culturas infectadas com o Itacaiunas e as infectadas com Curionopolis (Teste ANOVA: um critério, $p < 0,05$);

A análise da expressão da citocina TGF- β , 48h.p.i., mostrou níveis abaixo de 10pg/mL, além de não apresentar diferença entre as culturas controle e infectadas, tanto com o vírus Itacaiunas quanto com o Curionopolis.

A quantidade de TGF- β produzida nas co-culturas enriquecidas de astrócitos/neurônios e de microglia/neurônios infectadas com o vírus Itacaiunas (Figura 12a) e com o Curionopolis (Figura 12b) foi significativamente maior que a quantidade produzida nas co-culturas controles 96h.p.i.

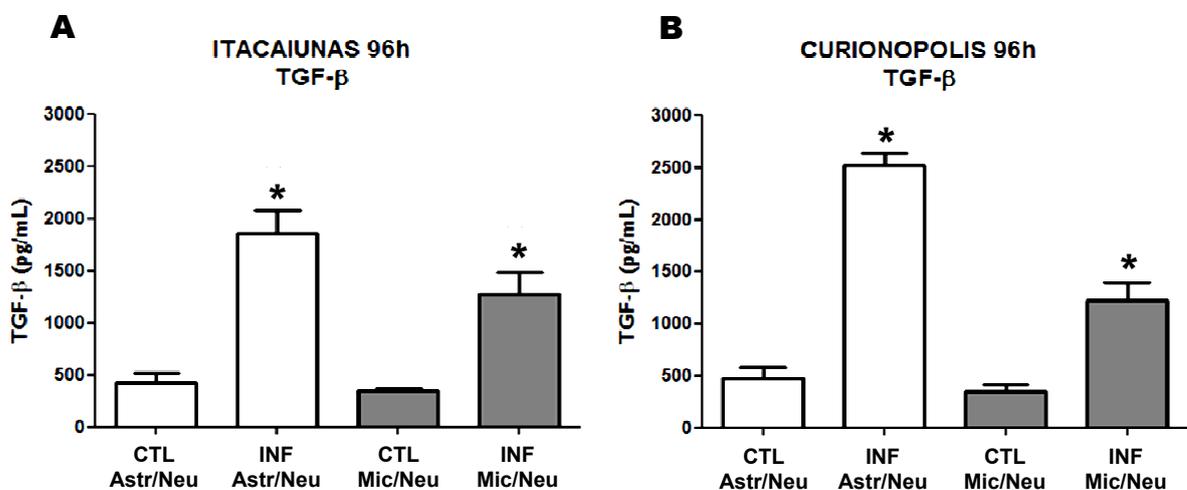


Figura 12: Análise da expressão da citocina TGF- β em co-culturas primárias enriquecidas de astrócitos/neurônios (Astr/Neu) e de microglia/neurônios (Mic/Neu) infectadas com o vírus Itacaiunas (A) e com o vírus Curionopolis (B) 96 h.p.i. CTL: controle; INF: infectado; (*) diferença significativa entre grupos controle e infectados (Teste ANOVA: um critério, $p < 0,05$);

4.5 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O reagente DAF-FM diacetato foi desenvolvido por Kojima e colaboradores (1998). O DAF-FM diacetato difunde passivamente pela membrana celular e é desacetilado por esterases intracelulares para se tornar DAF-FM. Esse composto não é fluorescente até que ele possa reagir com o ON para formar um benzotriazol fluorescente. Esse produto é detectado por microscópios de fluorescência, providos de filtro para fluoresceína (comprimento de onda: excitação 495nm/emissão 515nm).

Culturas enriquecidas de neurônios e co-culturas enriquecidas de células gliais/neurônios inoculadas com os vírus Itacaiunas e Curionopolis foram submetidas à técnica do DAF-FM diacetato para detecção de ON, nos tempos de 48 e 96h.p.i.

Em culturas de neurônios infectadas com o vírus Itacaiunas 48 e 96h.p.i. e com o vírus Curionopolis 48h.p.i. foi observada marcação discreta, não havendo diferença em relação as culturas controle. Entretanto, em culturas de neurônios infectados com o vírus Curionopolis 96h.p.i. foi observado aumento na intensidade de marcação (Figura 13).

Em co-culturas enriquecidas de células gliais/neurônios infectadas com o vírus Itacaiunas 48 e 96h.p.i. e com o vírus Curionopolis 48h.p.i. também foi observada marcação discreta, não havendo diferença em relação as culturas controle. Entretanto, em co-culturas de células gliais/neurônios infectadas com o vírus Curionopolis 96h.p.i. foi observado pequeno aumento na quantidade do produto da reação do ON celular com o DAF-FM (Figura 14).

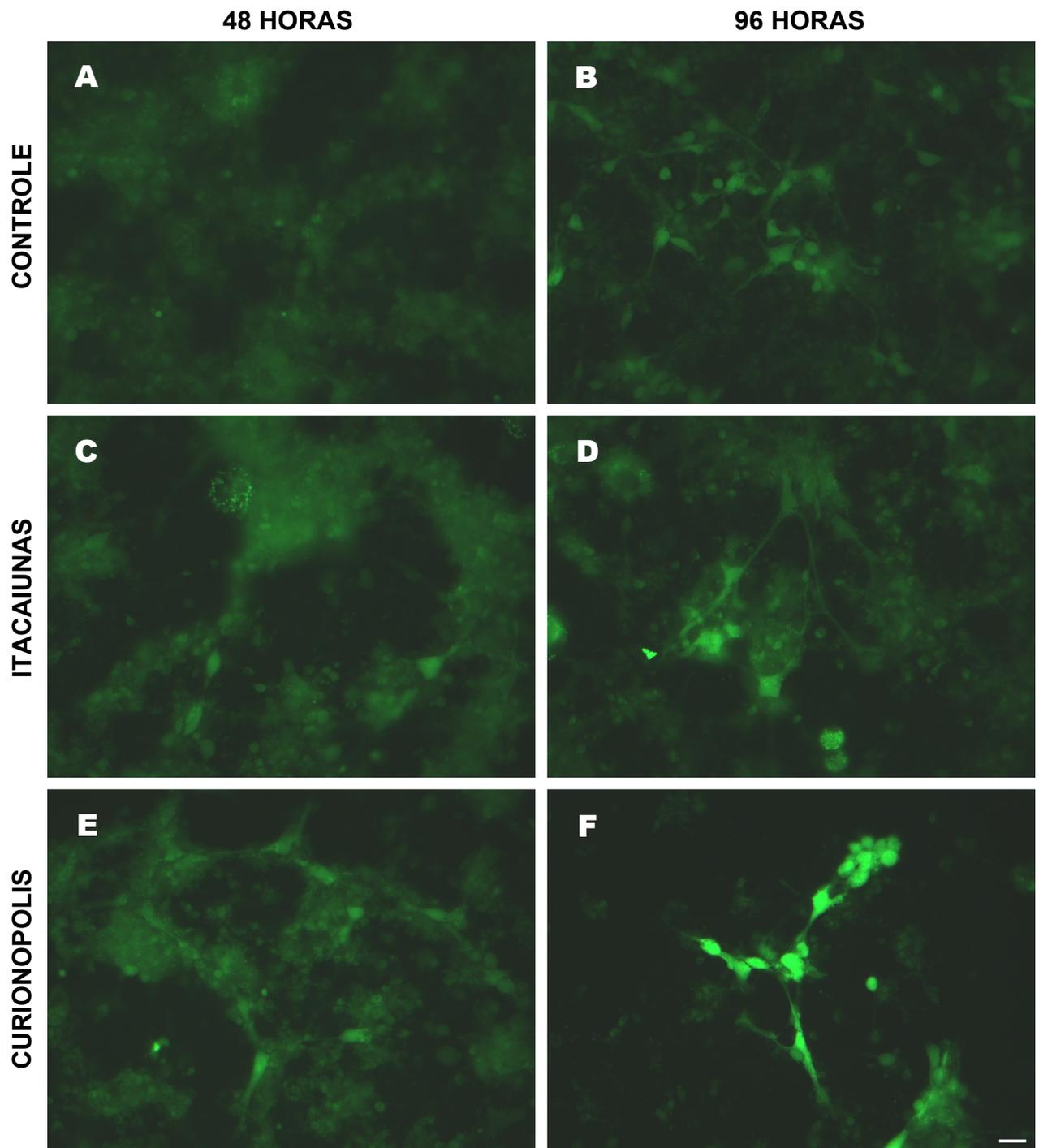


Figura 13: Fotomicrografias de fluorescência mostrando o produto da reação do óxido nítrico com DAF-FM em culturas de neurônios infectadas e não infectadas. Culturas controle 48 (A) e 96h.p.i. (B); Culturas Infectadas com o vírus Itacaiunas 48 (C) e 96h.p.i. (D); e culturas Infectadas com o vírus Curionopolis 48 (E) e 96h.p.i. (F). Notou-se marcação mais intensa em culturas infectadas com o vírus Curionopolis 96h.p.i. (F). Barra: 50 μ m, para todas as imagens.

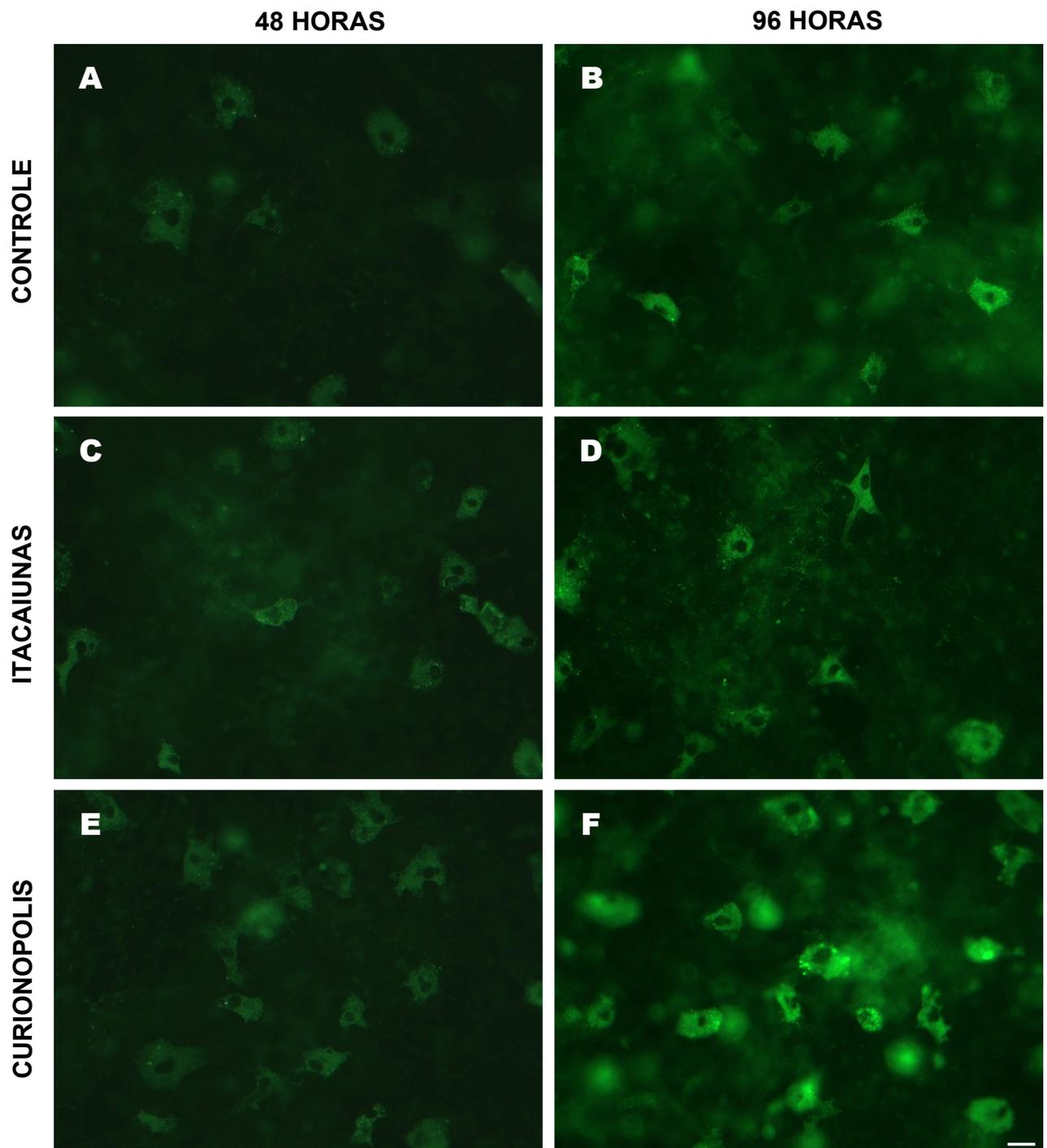


Figura 14: Fotomicrografias de fluorescência mostrando o produto da reação do óxido nítrico com DAF-FM em co-culturas de células gliais/neurônios infectadas e não infectadas. Co-culturas controle 48 (A) e 96h.p.i. (B); co-culturas infectadas com o vírus Itacaiunas 48 (C) e 96h.p.i. (D); e co-culturas infectadas com o vírus Curionopolis 48 (E) e 96h.p.i. (F). Verificou-se marcação mais intensa em co-culturas infectadas com o vírus Curionopolis 96h.p.i. (F) Barra: 50 μ m, para todas as imagens.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, camundongos albinos suíços neonatos e culturas primárias de células do SNC foram infectados com os vírus Itacaiunas e Curionópolis, com objetivo de analisar aspectos da imunidade inata do SNC, *in vivo* e *in vitro*, em resposta a esses agentes. Camundongos neonatos infectados com o vírus Itacaiunas apresentaram discreta ativação microglial e astrogliose nos tempos avaliados em distintas regiões do SNC, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo e o tálamo. A resposta inflamatória celular foi mais intensa nos animais infectados pelo vírus Curionópolis e variou com o tempo exibindo um crescimento inicial discreto e um valor de pico no tempo mais tardio da infecção. Em culturas primárias mistas foram detectados valores elevados dos níveis de citocinas, decorridos 4 dias a contar da infecção, mas apenas discreta elevação do óxido nítrico. A infecção pelos vírus Itacaiunas e Curionópolis *in vitro* induziu resposta imune com predominância da ação pró-inflamatória por IL-12 nos tempos iniciais da infecção, e uma tentativa de modulação dessa ação por citocinas anti-inflamatórias (TGF- β , IL-10) nos tempos tardios.

5.1 INFECÇÃO DO SNC PELOS VÍRUS ITACAIUNAS E CURIONÓPOLIS: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA GLIAL

Reações imunológicas são geradas em repostas a muitos eventos adversos no SNC, incluindo trauma, isquemia, doenças neurodegenerativas e infecções virais (HENEKA et al., 2010; NOBLE et al., 2006; PERRY et al., 2010). Os rabdovírus Itacaiunas e Curionópolis apresentam tropismo por células neuronais, causando encefalite aguda em camundongos albinos suíços neonatos (DINIZ et al., 2006; GOMES-LEAL et al., 2006). Nos momentos iniciais da infecção, por via nasal, observou-se a presença desses vírus nas meninges e bulbo olfatório. Ao longo da infecção, ambos os vírus se disseminaram por todo o parênquima cerebral, acometendo principalmente o córtex, o hipocampo e o tálamo (DINIZ et al., 2008).

As células gliais, especialmente astrócitos e microglias, são fundamentais para o controle da homeostase e para o sistema de defesa intrínseco do SNC (HENEKA et al., 2010; LEE et al., 2006). Injúrias no SNC são caracterizadas por

mudanças morfofisiológicas em microglias e astrócitos, conhecidas como gliose reativa (HENEKA et al., 2010; LEE et al., 2006).

A astrogliose é essencial para limitação das áreas de lesão (formação da cicatriz glial) e para o remodelamento e recuperação das funções neurais após injúrias (LI et al., 2008; PEKONY AND NILSSON, 2005; ROLLS et al., 2009). Os astrócitos reativos apresentam hiperplasia e hipertrofia e são caracterizados pelo aumento na quantidade de prolongamentos citoplasmáticos finos e de GFAP (HOZUMI et al., 1990; LIN e CAI, 2004; RIDET et al., 1997; BRAHMACHARI et al., 2006).

Camundongos Balb/c adultos infectados intranasalmente com VSV apresentaram intensa astrogliose ao longo da infecção, principalmente nas regiões do bulbo olfatório e hipocampo (BI 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. No presente trabalho, secções de cérebro de camundongos neonatos infectados com o vírus Itacaiunas apresentaram poucos astrócitos marcados por imunohistoquímica contra GFAP nos tempos avaliados (4 e 7 d.p.i.). Por outro lado, em animais infectados com o vírus Curionópolis foi observado aumento significativo no número de astrócitos marcados em comparação aos animais do grupo controle, no tempo mais tardio (5d.p.i.).

A ativação microglial é fundamental para a resposta imune no SNC. Essa reação ocorre em casos de injúrias ao SNC causadas por traumas, isquemias, substâncias estranhas, doenças neurodegenerativas e patógenos invasores. 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; LIU, 2006).

Ratos neonatos infectados com o *Borna disease virus* (BDV) mostraram intensa ativação microglial na região do giro denteado no hipocampo ao longo da infecção, com pico 30d.p.i. (OVANESOV et al., 2008). Camundongos Balb/c jovens infectados, intracerebralmente, com o vírus da raiva cepa CVS-11 apresentaram aumento no número de células microgliais, com morfologia amebóide, 3d.p.i., principalmente nas áreas do córtex e hipocampo (KOJIMA et al., 2010). De Sousa e colaboradores (2011) relataram que camundongos albinos suíços adultos infectados com o vesiculovirus *Piry* apresentaram intensa ativação microglial ao longo do

trajeto da infecção, principalmente nas áreas e núcleos do sistema olfatório, septum e hipocampo. Em nosso estudo, camundongos neonatos infectados com o vírus Itacaiunas apresentaram discreta marcação de microglias nos tempos avaliados (4 e 7d.p.i.), não se distinguindo do observado nos animais do grupo controle. Por outro lado, animais infectados com o vírus Curionopolis, quando comparados aos animais do grupo controle, apresentaram aumento significativo de microglias ativadas no tempo mais tardio da infecção (5d.p.i.), principalmente nas regiões do córtex, hipocampo e tálamo.

5.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS RESIDENTES DO SNC *IN VITRO*: A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Neurônios, astrócitos e microglias podem produzir vários mediadores inflamatórios, como citocinas/quimiocinas e seus receptores, que são expressos constitutivamente por todo o SNC, em níveis basais (LUCAS et al., 2006). Porém, em condições patológicas, essas células passam a produzir esses mediadores em maiores quantidades, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune (KAUR et al., 2010; OWENS et al., 2006).

A expressão da citocina IL-12 no SNC tem sido associada à diversas respostas inflamatórias como esclerose múltipla, encefalomielite alérgica experimental em ratos e camundongos e endotoxemia murina. É produzida por astrócitos e microglia e infiltrados de células do sistema imune (KAUR et al., 2010; LI et al., 2004; LYNCH, 2009; PAGENSTECHER et al., 2000). Também tem sido demonstrado que neurônios expressam receptores para essa citocina, mostrando que essas células também podem ser estimuladas por IL-12 (IRELAND e REISS, 2004).

Estudos demonstraram que durante as infecções virais ocorre a indução da expressão do gene que codifica IL-12 (CHESLER e REISS, 2002; COUTELIER et al., 1995; KOMATSU et al., 1997; KOMATSU et al., 1998 OLSON et al., 2001) e que tratamentos com essa citocina aumenta a sua expressão, sugerindo uma via autócrina (KOMATSU et al., 1998). Li e colaboradores (2004) observaram que os níveis das três principais citocinas pro-inflamatórias, IL-12p40, TNF- α e IL-6,

estavam elevados nos sobrenadantes de culturas de astrócitos infectados com o coronavírus neurotrópico MHV-A59.

Nossos resultados demonstraram aumento da expressão de IL-12 em sobrenadantes de culturas de células do SNC infectadas com os vírus Itacaiunas e Curionópolis nos tempos avaliados. A IL-12 induz a produção de IFN- γ (KOMATSU et al., 1999a; OWENS et al., 2006), potente fator ativador de microglia, que tem sido implicado na indução de iNOS e conseqüente aumento na produção de óxido nítrico por esse tipo celular (MIR et al., 2008). Entretanto, como em nossos experimentos foram detectados baixos níveis de IFN- γ e TNF- α , é possível que a ativação de microglias e astrócitos, na infecção pelo vírus Curionópolis, tenha ocorrido por outras vias de sinalização, como por exemplo, no trabalho de Hanisch (2002), que afirma ser IL-1 β a principal indutora de astrogliose. Os estudos de Moynagh (2005) relatam ainda que IL-1 ativa o fator de transcrição NF- κ B, que induz a expressão de moléculas inflamatórias.

Microglias podem ser ativadas por muitos fatores, incluindo RNA de fita dupla e fita simples de origem viral, proteínas virais, membranas bacterianas e neurônio apoptóticos (OVANESOV, et al., 2006; TURRIN, 2008).

Estudos tem demonstrado que microglias e astrócitos podem ser ativados através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (ARAVALLI et al., 2007; CARPENTIER et al., 2008; OKUN et al., 2009). Atualmente, quatro famílias desses receptores têm sido identificadas. Essas famílias incluem receptores transmembrana, como os receptores de lectina tipo C e os Toll-likes (TLRs), assim como proteínas citoplasmáticas, como receptores RIG-I-like (RLRs) e NOD-like (TAKEUCHI e AKIRA, 2010). Microglias, sob infecção persistente de *Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV), são ativadas, conduzindo a um aumento na expressão de TLR 2, 3, 5 e 9. Microglias ativadas com vários agonistas de TLRs expressaram citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-18 e TNF- α (OLSON e MILLER, 2004).

IL-12 é uma citocina clássica de resposta do tipo T_h1, tendo como uma das conseqüências de sua ação a inibição da expressão de IL-4, citocina típica de resposta T_h2 (KOMATSU, et al., 1999b), o que poderia explicar os níveis basais de IL-4 detectados nos sobrenadantes de culturas de células do SNC infectadas com os vírus Itacaiunas e Curionópolis.

A citocina antiinflamatória TGF- β é rapidamente elevada durante injúrias no SNC (BRIONNE et al., 2003; LAW et al., 2004). Estudos demonstram que TGF- β inibe a ativação da microglia por sua habilidade em reduzir a expressão de moléculas MHC II, citocinas pró-inflamatórias e intermediários reativos do oxigênio (SUZUMURA et al., 1993; O' KEEFE et al., 1999). Trabalhos mais recentes relatam que o TGF- β atua não simplesmente como uma citocina supressora da resposta imune, mas como uma proteína neuroprotetora que impede a degeneração cerebral provocada por intensas respostas inflamatórias (HANISCH, 2002; ROCK et al., 2004; VAN ROSSUN e HANISCH, 2004).

Em condições fisiológicas, o TGF- β é produzido por neurônios, astrócitos e microglias (LAW et al., 2004; MAKWANA et al., 2007). Boche e colaboradores (2003) demonstraram *in vivo* que TGF- β protege neurônios da morte excitotóxica, induzindo um fenômeno de tolerância cerebral em camundongos pré-tratados com LPS. Makwana e colaboradores (2007) relatam que a expressão desta citocina protege o hospedeiro contra encefalomielite alérgica experimental. Por outro lado, camundongos com deficiência no gene que codifica o TGF- β exibem forte neuroinflamação por todo o cérebro, astrogliose excessiva e proliferação de microglia com fenótipo ativado anormal (MAKWANA et al., 2007).

TGF- β diminui a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , induz apoptose e inibe a função de APCs, através da diminuição de MHC II e moléculas co-estimulatórias. Além disso, essa citocina inibe a atividade de iNOS, resultando na supressão da produção de óxido nítrico por macrófagos, e diminui a expressão de mRNA de receptores de quimiocinas em microglias (RANSOHOFF e BENVENISTE, 2006).

Nossos resultados demonstraram baixos níveis de TGF- β em culturas de células do SNC após 48 horas de infecção pelos vírus Itacaiunas e Curionopolis, no entanto, observamos aumento da expressão desta citocina após 96 horas de infecção por ambos os vírus. Estes resultados podem estar associados a uma tentativa de controlar a produção de citocinas inflamatórias, neste caso da IL-12, como descrito por Pagenstecher e colaboradores (2000) e Ransohoff e Benveniste (2006).

A IL-10 é uma citocina T_h2 clássica que inibe a produção de IFN- γ por células T_h1. Durante o curso de uma auto-imunidade no SNC, essa citocina pode ser

produzida por macrófagos, células T_H2, células B, células dendríticas, astrócitos e microglias (RANSOHOFF e BENVENISTE, 2006). Um processo inflamatório no cérebro é necessário para reparar danos teciduais, mas excessiva inflamação causa morte das células neurais. Em estudo recente foi demonstrado que a expressão de IL-10 contribui para a sobrevivência dos neurônios, inibindo, dessa forma, o processo inflamatório no cérebro (PARK et al., 2007). Nesse trabalho, os autores conduziram experimentos *in vivo* e observaram que IL-10 expressa no córtex cerebral de ratos estimulados com LPS preveniu a neurodegeneração. Na encefalomielite alérgica experimental, Cua e colaboradores (2001) relataram que, embora essa citocina possa prevenir a inflamação do sistema nervoso, a localização e o momento da sua produção pode determinar sua efetividade. Sugere ainda que a IL-10 poderia estar inibindo a produção de IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α , contribuindo para a recuperação do hospedeiro nessa doença.

Nossos resultados demonstraram que a IL-10 foi detectada em níveis baixos nas culturas de células do SNC infectadas com os vírus Itacaiunas e Curionópolis no período de 48 horas, no entanto, observamos aumento na expressão de IL-10 96h.p.i., principalmente nas co-culturas enriquecidas de microglias/neurônios infectadas pelo vírus Itacaiunas. Por outro lado, em co-culturas enriquecidas de astrócitos/neurônios infectadas com os vírus em estudo não houve aumento na expressão de IL-10. Para investigar melhor este fato, estudos específicos deverão ser realizados.

Quando comparado com o Itacaiunas, o vírus Curionópolis apresentou disseminação mais rápida pelo SNC, como descrito por Diniz e colaboradores (2008), e intensa ativação microglial e astrogliose no tempo mais tardio. Além disso, foi observado nas culturas de células do SNC infectadas com esse vírus grande produção da citocina IL-12p40.

Estudo demonstrou que IL-12 inibe a replicação de VSV através da indução de NOS-1 em neurônios *in vivo*. Camundongos *knockout* para NOS-1 foram mais suscetíveis à infecção letal e o tratamento com a citocina não impediu esse fato (KOMATSU et al., 1999b). Bi e Reiss (1995), utilizando culturas de neuroblastoma murino, mostraram que o ON tem potente efeito anti-VSV.

Em nosso trabalho, foi observado aumento na produção de IL-12p40 e ON em culturas de células do SNC infectadas com o vírus Curionópolis 96h.p.i., porém, esses fatos não contribuíram para inibição da replicação viral, pois esse vírus

invariavelmente causa encefalite letal em 100% da população de camundongos neonatos inoculados, como descrito por Diniz e colaboradores (2008). Chesler e Reiss (2002) também mostraram que a IL-12, embora benéfica, não é essencial para eliminação do VSV em camundongos infectados e Liñares e colaboradores (2006) relatam ainda que o ON tem sido associado a vários processos patológicos (LIÑARES et al., 2006). Estudos têm sugerido que ON desempenha um papel deletério em doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla (BRENNER et al., 2001; DUNCAN e HEALES, 2005). Níveis elevados de ON no SNC podem, em determinadas condições, causar morte neuronal por vários mecanismos, como inibição da respiração mitocondrial e liberação de glutamato a partir de neurônios e glia, resultando em excitotoxicidade (BAL-PRICE e BROWN, 2001).

Microglias ativadas são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias no SNC, porém essas células também podem apresentar uma ação contrária com a produção de IL-10 e TGF- β que inibem a resposta inflamatória dessa célula, através de um *feedback* negativo autócrino (KIM e DE VELLIS, 2005; KIM e NAGAI, 2010).

Thackray e colaboradores (2004) demonstraram que camundongos *knockout* para o gene da IL-10 desenvolvem a doença príon mais rápido que camundongos tipo selvagem, sugerindo que essa citocina desempenha um importante papel na limitação do curso da doença. No trabalho de Swarup e colaboradores (2007) foi também observado que em camundongos inoculados intracerebralmente com o *Japanese encephalitis virus* (JEV) ocorreu diminuição de IL-10 ao longo da infecção. Esse mesmo trabalho demonstrou que em culturas de células microgлияis infectadas com JEV e tratadas com IL-10 houve inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas do oxigênio.

Outro estudo mostrou que animais *knockout* para TGF- β com axotomia facial desenvolveram forte resposta inflamatória por todo o cérebro, intensa astrogliose e ativação de microglias (MAKWANA et al., 2007). Pagenstecher e colaboradores (2000) relataram que em camundongos com encefalomielite alérgica experimental induzida houve aumento da expressão do gene que codifica o TGF- β em paralelo a grande produção de IL-12, além de outras citocinas pró-inflamatórias. Esse mesmo autor sugere que o aumento da expressão de TGF- β no cérebro pode ter constituído uma resposta protetora, reduzindo danos causados pela resposta inflamatória.

A maior expressão de IL-10 nas culturas infectadas pelo vírus Itacaiunas poderia talvez justificar a discreta ativação glial observada em camundongos

infectados com esse vírus, uma vez que essa citocina apresenta características antiinflamatória, imunossupressora e neuroprotetora (EJRNAES et al., 2006; HANISCH, 2002; YANG et al., 2010). Além disso, o TGF- β , detectado em culturas de células do SNC infectadas com o vírus Itacaiunas, pode também ter exercido um papel relevante na proteção do SNC, pois essa citocina é relacionada à sobrevivência celular definida pela ação de fatores neurotróficos gliais (STOIKA e FIL'CHENKOV, 2001).

Diniz e colaboradores (2008) demonstraram que o vírus Itacaiunas apresentou uma disseminação mais lenta no SNC quando comparado com o vírus Curionópolis. Provavelmente, o aspecto mais lento do vírus associado à produção de TGF- β , elevada expressão da citocina IL-10 e pequena produção de óxido nítrico podem ter contribuído para a sobrevivência de 65% dos camundongos neonatos infectados com o Itacaiunas, como descrito por Diniz e colaboradores (2008). Por outro lado, a disseminação mais rápida do vírus Curionópolis associada à maior ativação glial e conseqüente produção de ON podem ter contribuído para morte de 100% dos animais infectados.

O presente trabalho investigou eventos da imunidade inata de células residentes do SNC de camundongos infectados com os vírus Itacaiunas e Curionópolis. No entanto, outros aspectos deverão ser avaliados para complementar esses achados, como por exemplo, o envolvimento de PRRs, a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e IFNs do tipo I e identificação de células de infiltrado inflamatório envolvidas na resposta imune contra os vírus em estudo no SNC.

6 CONCLUSÃO

- A inoculação intranasal dos vírus Itacaiunas e Curionópolis foi seguida de neuroinvasão da via olfatória reproduzindo achados anteriores de nosso Laboratório.

- A resposta celular inflamatória medida através da estimativa estereológica do número de microglias e astrócitos revelou que o vírus Curionópolis quando comparado ao Itacaiunas parece induzir maior gliogênese e possivelmente maior lesão neuropatológica associada.

- A resposta inflamatória parece variar em função do tempo atingindo um pico em tempos tardios da infecção. Nós sugerimos que essa variação guarda relação direta com o grau de neuroinvasão associado.

- Coerentemente com esses achados, os níveis de citocina e de óxido nítrico em culturas primárias parecem variar em função do tempo de infecção reproduzindo o ciclo de ativação inicial discreto, seguido de aumento de liberação em 96h a contar da infecção que é seguida de tentativa de modulação tardia da resposta inflamatória.

- Outros mecanismos moleculares associados a esses eventos permanecem por ser investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ACARIN, L.; VELA, J. M.; GONZÁLEZ, B.; CASTELLANO, B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. **J Histochem Cytochem**, v. 42, n. 8, p. 1033-1041, 1994.
- ACARIN, L.; GONZÁLEZ, B.; CASTELLANO, B.; CASTRO, A. J. Microglial response to N-methyl-D-aspartate-mediated excitotoxicity in the immature rat brain. **J Comp Neurol**, v.367, n.3, p.361-374, 1996.
- AKIYAMA, H.; TOOYAMA, I.; KONDO, H.; IKEDA, K.; KIMURA, H.; McGEER, E. G.; McGEER, P. L. Early response of brain resident microglia to kainic acid-induced hippocampal lesions. **Brain Res**, v. 635, n. 1-2, p. 257-68, 1994.
- ALLAN, M. S.; ROTHWELL, N. J. Inflammation in Central Nervous System Injury. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, p. 1669-1677, 2003.
- ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, p. 165-79, 2001.
- ALOISI, F. **Cytokine production**. In: Neuroglia. KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. Oxford University Press. 2thed. New York. p. 285-301, 2005.
- ARAVALLI, R. N.; PETERSON, P. K.; LOKENSGARD, J. R. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 2, n. 4, p. 297-312, 2007.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K. & SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J Med Res.**, v. 119, n. 6, p.238-58, 2004.
- 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.
- BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **J Neurosci**, v. 21, n. 17, p. 6480-91, 2001.
- BARNA, M.; KOMATSU, T.; BIA, Z; REISS, C. S. Six differences in the susceptibility to viral infection of the central nervous system. **J Neuroimmunol.**, v. 67, p. 31-39, 1996.
- 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.

BARNETT, E.M.; PERLMAN, S. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. **Virology**, v. 194, p. 185-191, 1993.

BARRADAS, P. C.; CAVALCANTE, L. A. Proliferation of differentiated glial cells in the brain stem. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 2, p. 257-70, 1998.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v. 257, n. 5069, p. 545-548, 1992.

BARRON, K. D.; MARCIANO, F. F.; AMUNDSON, R.; MANKES, R. Perineuronal glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. **Brain Res**, v. 523, n. 2, p. 219-229, 1990.

BECHER, B.; PRAT, A.; ANTEL, J. P. Brain-immune connections: immunoregulatory properties of CNS-resident cells. **Glia**, v. 29, p. 293-304, 2000.

BENVENISTE, E. N.; TANG, L. P.; LAW, R. M. Differential regulation of astrocytes TNF- α expression by cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10. **Int J Dev Neurosci**, v. 13, p. 341-349, 1995.

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

BI, Z.; BARNA, M.; KOMATSU, T.; REISS, C. S. Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. **J Virol**, v. 69, n. 10, p. 6466-72, 1995.

BLACKSTAD, T. W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J Comp Neurol**, v. 105, n. 3, p. 417-537, 1956.

BOCHE, D.; CUNNINGHAM, C.; GAULDIE, J.; PERRY, V. H. Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 23, n. 10, p. 1174-82, 2003.

BONTHIUS, D. J.; MCKIM, R.; KOELE, L.; HARB, H.; KARACAY, B.; MAHONEY, J.; PANTAZIS, N. J. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 14, n. 1, p. 45-57, 2004.

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.

BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, p. 149-160, 2008.

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.

BRENNER, T.; PINTO, F.; ABRAMSKY, O.; GALLILY, R. Inhibition of nitric oxide production for down-regulation of CNS inflammation and demyelination. **Prog Brain Res**, v. 132, p. 499-506, 2001.

BREWER, G. J. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. **J Neurosci Res**, v.42, n. 5, p.674-83, 1995.

BRIONNE, T. C.; TESSEUR, I.; MASLIAH, E.; WYSS-CORAY, T. Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. **Neuron**, v. 40, n. 6, p. 1133-1145, 2003.

BROWN, J.; COOPER-KUHN, C. M.; KEMPERMANN, G.; VAN PRAAG, H.; WINKLER, J.; GAGE, F. H.; KUHN, H. G. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. **Eur J Neurosci**, v. 17, p. 2042-2046. 2003.

BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcgamma receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2101-8, 2005.

CARPENTIER, P. A.; DUNCAN, D. S.; MILLER, S. D. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 2, p. 140-147, 2008.

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

CHARLES, P. C.; WALTERS, E.; MARGOLIS, F.; JOHNSTON, R. E. Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. **Virology**, v. 208, p. 662-671, 1995.

CHESLER, D. A.; REISS, C. S. The role of IFN- γ in immune responses to viral infections of the central nervous system. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, p. 441-454, 2002.

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. 92-97, 2002.

COUTELIER, J. P.; VAN BROECK, J.; WOLF, S. F. Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. **J Virol**, v. 69, n. 3, p. 1955-1958, 1995.

CROEN, K.D. Evidence for an antiviral effect of nitric oxide. **J Clin Invest**, v. 91, p. 2446-2452, 1993.

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.

CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiol Aging**, v. 15, n. 3, p. 377-378, 1994.

CUA, D. J.; HUTCHINS, B.; LAFACE, D. M.; STOHLMAN, S. A.; COFFMAN, R. L. Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 166, n. 1, p. 602-608, 2001.

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.

DECKERT-SCHLÜTER, M.; BLUETHMANN, H.; KAEFER, N.; RANG, A.; SCHLÜTER, D. Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrose factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis. **Am J Pathol**, v. 154, p. 1549-1551, 1999.

DEL VECCHIO, M.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M. T.; WESA, A.; PARMIANI, G.; ANICHINI, A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 4677-85, 2007.

DELACOURTE, A. General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. **Neurology**, v. 40, n. 1, p. 33-37, 1990.

DIAS, L. B. **Patologia natural e experimental de arbovírus e vírus correlatos isolados na Amazônia**. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical, Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, v. 1, p. 439-450, 1986.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2006.

DINIZ, J. A.; 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 *Bracorhabdovirus* Infection. **Plos One**, v. 3, n. 3, p. 1-12, 2008.

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

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune functions of astrocytes. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 180-90, 2001.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. Nitric oxide and neurological disorders. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 1-2, p. 67-96, 2005.

EJRNAES, M.; FILIPPI, C. M.; MARTINIC, M. M.; LING, E. M.; TOGHER, L. M.; CROTTY, S.; VON HERRATH, M. G. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. **J Exp Med**, v. 203, n. 11, p. 2461-2472, 2006.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. **Virology**, v. 2, p. 59, 2005.

ESIRI, M.M.; TOMLINSON, A.H. Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory and trigeminal pathways after infection of facial skin in mice. **J Neurol Sci**, v. 64, p. 213-217, 1984.

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**, v. 18, n. 75, p. 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. 4950-4958, 1991.

FREI, K.; LINS, H.; SCHWERDEL, C.; FONTANA, A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and cytokine production depends on the inducing signals and the type of the cell analysed. **J Immunol**, v. 152, p. 2720-2728, 1994.

GLASER, J. R.; GLASER, E. M. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. **J Chem Neuroanat**, v. 20, n. 1, p. 115-26, 2000.

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

GOMES-LEAL, W.; MARTINS, L. C.; DINIZ, J. A. P.; 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 Trop**, v. 97, p. 126-139, 2006.

GOTZ, M.; BRADE, Y. A. Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. **Neuron**, v. 46, p. 369–372, 2005.

GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J.; KREUTZBERG, G. W. The third glial cell type, the microglia: cellular markers of activation in situ. **Acta Histochem Suppl**, v. 38, p. 57-160, 1990.

GRAEBER, M. B.; KREUTZBERG, G. W. Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons. **J Neurocytol**, v. 15, n. 3, p. 363-373, 1986.

GUBLER, D. J., KUNO, G. & SATHER, G. E. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 33, n. 1, p. 158-165, 1984.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B.; KIËU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. **J Microsc**, v. 193, p. 199-211, 1999.

HAGA, S.; AKAI, K.; ISHII, T. Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. **Acta Neuropathol**, v. 77, n. 6, p. 569-575, 1989.

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

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

HOWARD, C.; M. REED. **Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy**. 2thed. 2005.

HOZUMI, I.; CHIU, F. C.; NORTON, W. T. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. **Brain Res**, v. 524, n. 1, p. 64-71, 1990.

HUANG, S. S.; HUANG, J. S. TGF- β control of cell proliferation. **J Cell Biochem**, v. 96, p. 447–462, 2005.

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.

IRELAND, D. D.; REISS, C. Expression of IL-12 receptor by neurons. **Viral Immunol**, v. 17, n. 3, p. 411-22, 2004.

JANDER, S.; POHL, J.; D'URSO, D.; GILLEN, C.; STOLL, G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. **Am J Pathol**, v. 152, p. 975-982, 1998.

JORGENSEN, M. B.; FINSEN, B. R.; JENSEN, M. B.; CASTELLANO, B.; DIEMER, N. H.; ZIMMER, J. Microglia and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat. **Exp Neurol**, v. 120, n. 1, p. 70-80, 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.

KEHRL, J. H.; WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B.; JAKOWLEW, S.; ALVAREZ-MON, M.; DERYNCK, R.; SPORN, M. B.; FAUCI, A. S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J Exp Med**, v. 163, p. 1037-50, 1986.

KIM, S.U.; DE VELLIS, J. Microglia in health and disease. **J Neurosci Res**, v. 81, p. 302-13, 2005.

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.

KIMOTO, H.; ETO, R.; ABE, M.; KATO, H.; ARAKI, T. Alterations of glial cells in the mouse hippocampus during postnatal development. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, p. 1181-1189, 2009.

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. 72, n. 8, p. 1011-1016, 2010.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, M.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Anal Chem**, v. 70, n. 13, p. 2446-2453, 1998.

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.; IRELAND, D. D. C.; REISS, C. S. IL-12 and viral infections. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, n. 3-4, p. 277-285, 1998.

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.

KRIEGLSTEIN, K.; STRELAU, J.; SHOBER, A.; SULLIVAN, A.; UNSICKER, K. TGF-beta and regulation of neuron survival and death. **J Physiol**, v. 96, p. 25-30, 2002.
KUSHNER, I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 9, p. 191-196, 1998.

LAFAY, F.; COULON, P.; ASTIC, L.; SAUCIER, D.; RICHE, D.; HOLLEY, A.; FLAMAND, A. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. **Virology**, v. 183, p. 320-330, 1991.

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.

LEDEBOER, A.; BREVÉ, J.J.; WIERINCKX, A.; VAN DER JAGT, S.; BRISTOW, A. F.; LEYSEN, J. E.; TILDERS, F. J. H.; VAN DAM, A. M. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **Eur J Neurosci**, v. 16, p. 1175-1185, 2002.

LEE, S. C.; COSENZA, M. A.; SI, Q.; RIVIECCIO, M.; BROSNAN, C. S. **The CNS: cells, tissues, and reactions to insult**. In: Cytokines and the CNS. RANSOHOFF, R. M.; BENVENISTE, E. N. 2th ed. Florida, p. 1-22, 2006.

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.

LI, L.; LUNDKVIST, A.; ANDERSSON, D.; WILHELMSSON, U.; NAGAI, N.; PARDO, A.C.; NODIN, C.; STAHLBERG, A.; APRICO, K.; LARSSON, K.; YABE, T.; MOONS, L.; FOTHERINGHAM, A.; DAVIES, I.; CARMELIET, P.; SCHWARTZ, J.P.; PEKNA, M.; KUBISTA, M.; BLOMSTRAND, F.; MARAGAKIS, N.; NILSSON, M.; PEKNY, M. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28, p. 468–481. 2008.

LIMA, F. R. S.; GERVAIS, A.; COLIN, C.; IZEMBART, M.; NETO, V. M.; MALLAT, M. Regulation of microglial development: A novel role of thyroid hormone. **J Neurosci**, v.21, n. 6, p. 2828-2838, 2001.

LIN, J.; CAI, W. Effect of Vimentin on Reactive Gliosis: *In Vitro* and *In Vivo* Analysis. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 11, p. 1671-1682, 2004.

LIN, P. L.; PLESSNER, H. L.; VOITENOK, N. N.; FLYNN, J. L. Tumor necrosis factor and tuberculosis. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 12, p. 22-5, 2007.

LIÑARES, D.; TACONIS, M.; MAÑA, P.; CORRECHA, M.; FORDHAM, S.; STAYKOVA, M.; WILLENBORG, D. O. Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. **J Neurosci**, v. 26, n. 49, p. 12672-81, 2006.

LING, E. M.; ROBINSON, D. S. Transforming growth factor-beta1: its anti-inflammatory and pro-fibrotic effects. **Clin Exp Allergy**, v. 32, p. 175-178, 2002.

LIU, B. Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. **AAPS J**, v. 8, p. 606-621, 2006.

LONG, J. M.; KALEHUA, A. N.; MUTH, N. J.; HENGEMIHLE, J. M.; JUCKER, M.; CALHOUN, M. E.; INGRAM, D. K.; MOUTON, P. R. Stereological estimation of total microglia number in mouse hippocampus. **J Neurosci Methods**, v. 84, n. 1-2, p. 101-108, 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.; NORRBY, E. Selective infections of olfactory and respiratory epithelium by vesicular stomatitis and Sendai viruses. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 13, p. 111-122, 1987.

LUO, J.; HO, P. P.; BUCKWALTER, M. S.; HSU, T.; LEE, L. Y.; ZHANG, H.; KIM, D.; KIM, S.; GAMBHIR, S. S.; STEINMAN, L.; WYSS-CORAY, T. Glia-dependent TGF- β signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3306-3315, 2007.

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

MACHADO, G. F.; MAIORKA, P. C.; CANDIOTO, C. G.; IEIRI, L. M. U.; ALESSI, A. C. Immunohistochemical detection of GFAP and TGF- β 1 in C57Bl6 mice during acute vesicular stomatitis virus encephalitis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 83-88, 2006.

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

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.; RAVICH, G. Endogenous transforming growth factor beta 1 suppresses inflammation and promotes survival in adult CNS. **J Neurosci**, v. 27, n. 42, p. 11201-13, 2007.

McCARTHY K. D.; DE VELLIS. J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. **J Cell Biol**, v.85, p.890–902,1980.

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.

MOLINA-HOLGADO, E.; VELA, J.M.; AREVALO-MARTIN, A.; GUAZA, C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. **Br J Pharmacol**, v. 131, p. 152-159, 2001.

MOURA NETO, V.; MALLAT, M.; JEANTET, C.; PROCHIANTZ, A. Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. **EMBO J**, v. 2, n.8, p.1243-1248, 1983.

MOYNAGH, P. N. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. **J Anat**, v. 207, n. 3, p. 265-9. 2005.

MURPHY, F. A.; KINGSBURY, D. W. **Virus taxonomy**. In: Virology. FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HONLEY, P. M., et al. 3thed. Raven, New York. p. 15-57, 1996.

NAKAMURA, Y. Regulating 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.

NGUYEN, L. H.; KNIPE, D. M.; FINBERG, R. W. Replication-defective mutants of herpes simplex virus (HSV) induce cellular immunity and protect against lethal HSV infection. **J Virol**, v. 66, n. 12, p. 7067-7072, 1992.

NGUYEN, M.D.; JULIEN, J. P.; RIVEST, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 3, p. 216-227, 2002.

NOBLE, M.; MAYER-PRÖSHEL, M.; MOCK, D.; PRÖSHEL, C. **Inflammatory complexities in the CNS**: New insights into the effects of intracellular redox state and viral infection in modulating the biology of oligodendrocytes and their precursor cells. In: Cytokines and the CNS. RANSOHOFF, R. M.; BENVENISTE, E. N. 2th ed. Florida, 2006.

O'KEEFE, G. M.; NGUYEN, V. T.; BENVENISTE, E. N. Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 4, p. 1275-85, 1999.

OKUN, E.; GRIFFIOEN, K. J.; LATHIA, J. D.; TANG, S. C.; MATTSON, M. P.; ARUMUGAM, T. V. Toll-like receptors in neurodegeneration. **Brain Res Rev**, v. 59, n. 2, p. 278-292, 2009.

OLSON, J. K.; GIRVIN, A. M.; MILLER, S. D. Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. **J Virol**, v. 75, p. 9780–9789, 2001.

OLSON, J. K.; MILLER, S. D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. **J Immunol**, v. 173, n. 6, p. 3916-24, 2004.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2006.

OVANESOV, M. V.; MOLDOVAN, K.; SMITH, K.; VOGEL, M. W.; PLETNIKOV, M. V. Persistent Borna Disease Virus (BDV) infection activates microglia prior to a detectable loss of granule cells in the hippocampus. **J Neuroinflammation**, v. 19, n. 5, p. 1-4, 2008.

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.

PAGENSTECHE, A.; LASSMANN, S.; CARSON, M. J.; KINCAID, C.; STALDER, A. K.; CAMPBELL, I. L. Astrocyte-Targeted Expression of IL-12 Induces Active Cellular Immune Responses in the Central Nervous System and Modulates Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 164, n. 9, p. 4481-4492, 2000.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A. & MOLDAWER, L. L. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, p. 736-46, 2003.

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.

PAUL, A. T.; GOHIL, V. M.; BHUTANI, K. K. Modulating TNF-alpha signaling with natural products. **Drug Discov Today**, v. 11, p. 725-32. 2006.

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

PERRY, V. H.; MATYSZAK, M. K.; FEARN, S. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 60-7, 1993.

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 4, p. 193-201, 2010.

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.

PONOMAREV, E. D.; MARESZ, K.; TAN, Y.; DITTEL, B. N. CNS-derived interleukin-4 essential for the regulation of autoimmune inflammation and induce a stage of alternative activation in microglial cells. **J. Neurosci**, v. 27, p. 10714-10721, 2007.

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.

PRAT, B. M.; MACPHERSON, J. M. TGF- β in the central nervous system: potential roles in ischemic injuries and neurodegenerative diseases. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, p. 267-292, 1997.

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.

REISS, C. S.; KOMATSU, T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? **J Virol**, v. 72, p. 4547-4551, 1998.

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.

RIDET, J. L.; MALHOTRA, S. K.; PRIVAT, A.; GAGE, F. H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 570-77, 1997.

ROCK, R. B.; GEKKER, G.; HU, S.; SHENG, W. S.; CHEERAN, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 942-964, 2004.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 235-241. 2009.

ROTTENBERG, M.; KRISTENSSON, K. Effects of interferon- γ on neuronal infections. **Viral Immunol**, v. 15, n. 2, p. 247-260, 2002.

ROZENFELD, C.; MARTINEZ, R.; FIGUEIREDO, R. T.; BOZZA, M. T.; LIMA, F. R.; PIRES, A. L.; SILVA, P. M.; BONOMO, A.; LANNES-VIEIRA, J.; DE SOUZA, W.; MOURA-NETO, V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-regulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. **Infect Immun**, v. 71, n. 4, p. 2047-2057, 2003.

SCHMITZ, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. **Anat Embryol (Berl)**, v. 198, n. 5, p. 371-97, 1998.

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **J Chem Neuroanat**, v. 20, n. 1, p. 93-114, 2000.

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. A.; REIS, R.; BENTO-TORRES, J.; TRÉVIA, N.; LINS, N. A. A.; PASSOS, A.; SANTOS, Z.; DINIZ, J. A. P.; VASCONCELOS, P.; CUNNINGHAM, C.; PERRY, V. H.; PICANÇO-DINIZ, C. V. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino swiss mice. **Plos one**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2011.

STEINMAN, L. Nuanced roles of cytokines in three major brain disorders. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3557-63, 2008.

STENGER, S.; RING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase is Closely Associated with Resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med**, v. 180, p. 783 -793, 1994.

STOIKA, R. S.; FIL'CHENKOV, O. O. Dual function of Transforming Growth Factor- β in the control of proliferation and apoptosis of cells of the nervous system. **Neurophysiology**, v. 33, n. 5, p. 331-338, 2001.

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

STREIT, W. J. **Microglial cells**. In: Neuroglia. KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. Oxford University Press. 2thed. New York. p. 60-71, 2005.

STRLER, K.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; BROUSSARD, S. R.; JOHNSON, R. W.; FREUND, G. G.; DANTZER, R.; KELLEY, W. K. Interleukin-10 in the brain. **Crit Rev Immunol**, v. 21, p. 427-449, 2001.

SUZUMURA, A.; SAWADA, M.; YAMAMOTO, H.; MARUNOUCHI, T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. **J Immunol**, v. 151, n. 4, p. 2150-8, 1993.

STOIKA, R. S. FIL'CHENKOV, O. O. Dual function of transforming growth factor- β in the control of proliferation and apoptosis of cells of the nervous system. **Neurophysiology**, v. 33, n. 5, p. 331-338, 2001.

SWARUP, V.; GHOSH, J.; DUSEJA, R.; GHOSH, S.; BASU, A. Japanese encephalitis virus infection decrease endogenous IL-10 production: Correlation with microglial activation and neuronal death. **Neurosci Lett**, v. 420, p. 144-149, 2007.

SZCZEPANIK, A. M.; FUNES, S.; PETKO, W.; RINGHEIM, G. E. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A β (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. **J Neuroimmunol**, v. 15, p. 49-62, 2001.

TAKEUCHI, O; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805–820, 2010

THACKRAY, A. M.; MCKENZIE, A. N.; KLEIN, M. A.; LAUDER, A.; BUJDOSO, R. Accelerated Prion Disease in the Absence of Interleukin-10. **J Virol**, v. 78, n. 24, p. 13697-13707, 2004.

TORDO, N.; BENMANSOUR, A.; CALISHER, C.; DIETZGEN, R. G.; FANG, R. X.; JACKSON, A. O.; KURATH, G.; NADIN-DAVIS, S.; TESH, R. B.; WALKER, P. J. **Family Rhabdoviridae**. In: Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses. FAUQUET, C .M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. San Diego, California, p. 623 – 644, 2005.

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.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; PINHEIRO, F. P.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DIAS, L. B.; CRUZ, A. C. R. **Arboviruses isolated in Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon Region, their known hosts, and their pathology for man**. In: An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries. TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., p. 19-31, 1998.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, p. 229-242, 2007.

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. **Virol J**, v. 5, n. 154, 2008.

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

VAN DENBERG, K. J.; GRAMSBERGEN, J. B. Long-term changes in glial fibrillary acidic protein and calcium levels in rat hippocampus after a single systemic dose of kainic acid. **Ann NY Acad Sci**, v. 28, n. 679, p. 394-401, 1993.

VAN DER POEL, W. H.; VAN DER HEIDE, R.; VAN AMERONGEN, G.; VAN KEULEN, L. J.; WELLENBERG, G. J.; BOURHY, H.; SCHAFTENAAR, W.; GROEN, J.; OSTERHAUS, A. D. Characterization of a recently isolated lyssavirus in frugivorous zoo bats. **Arch Virol**, v. 145, p. 1919-1931, 2000.

VAN ROSSUM, D.; HANISCH, U. K. Microglia. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 393-411, 2004.

VINCENT, V. A.; TILDERS, F. J.; VAN DAM, A. M. Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta. **Glia**, v. 19, p. 190–198, 1997.

WAGNER, R.R.; ROSE, J.K. **Rhabdoviridae**: The viruses and their replication. In: Virology. FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HONLEY, P.M., 3th ed. Raven Pren, New York, p. 1121-1152, 1996.

WAHL, S. M. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. **J Exp Med**, v. 180, p. 1587-1590, 1994.

WESEMANN, D. R.; BENVENISTE, E. N. **Cytokine and chemokine receptors and signaling**. In: Neuroglia. KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. Oxford University Press. 2thed. New York. p. 146-162, 2005.

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

WINK, D.; KASPRZAK, K. S.; MARAGOS, C. M.; ELESPURU, 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.

YANG, I.; HAN, S. J.; KAUR, G.; CRANE, C.; PARSA, A. T. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. **J Clin Neurosci**, v. 17, p. 6-10, 2010.

ZHANG, K.; SHOWALTER, M.; REVOLLO, J.; HSU, F. F.; TURK, J.; BEVERLEY, S. M. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in Leishmania. **EMBO J**, v. 22, n. 22, p. 6016-6026, 2003.

ZHU, B. C.; LAINE, R. A. Purification of acetyllactosamine-specific tomato lectin by erythroglucan-sepharose affinity chromatography. **Prep Biochem**, v. 19, n. 4, p. 341-350, 1989.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DO IEC



Parecer de Aprovação Nº 0026/2008/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - Nº 0021/2008

Ananindeua/PA, 07 de novembro de 2008.

Projeto: "Eventos patogênicos iniciais e tardios de encefalite experimental induzida pelos rhabdovirus itacaiunas e curionopolis em camundongos albinos suíços".

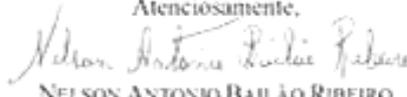
Pesquisador Responsável: **José Antonio Picanço Diniz Junior**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este CEPAN, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,



NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO

Coordenador do CEPAN/IEC

ANEXO B – PARÂMETROS ESTEREOLÓGICOS PARA MICROGLIAS ATIVADAS

Animais	a (μm^2)	A (X,Y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	Nº de blocos	Nº de secções	ΣQ
Animal 1	40x40	100x100	0,16	1,56	0,25	129	5	111
Animal 2	40x40	100x100	0,16	1,83	0,25	171	5	182
Animal 3	40x40	100x100	0,16	1,69	0,25	190	5	143
Animal 4	40x40	100x100	0,16	1,43	0,25	156	5	105
Animal 5	40x40	100x100	0,16	1,26	0,25	182	5	191

Parâmetros experimentais e resultados do número de blocos e do total de marcadores (ΣQ), obtidos pelo fracionador óptico, na estimativa de microglias ativadas em CA3 em todos os animais analisados. Área do bloco de contagem (a); área da matriz de contagem (A - X,Y); asf: área do bloco/área da matriz; tsf: altura do bloco/espessura da secção; ssf: secções contadas/total de secções.

ANEXO C – PARÂMETROS ESTEREOLOGICOS PARA ASTRÓCITOS

Animais	a (μm^2)	A (X,Y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	Nº de blocos	Nº de secções	ΣQ
Controle 1	40x40	60x60	0,44	1,49	0,25	170	5	230
Controle 2	40x40	60x60	0,44	1,76	0,25	198	5	239
Controle 3	40x40	60x60	0,44	1,83	0,25	166	5	239
Controle 4	40x40	60x60	0,44	1,71	0,25	190	5	252
Controle 5	40x40	60x60	0,44	1,70	0,25	149	5	196
Infectado 1	40x40	60x60	0,44	1,64	0,25	213	5	408
Infectado 2	40x40	60x60	0,44	1,83	0,25	166	5	239
Infectado 3	40x40	60x60	0,44	1,70	0,25	256	5	241
Infectado 4	40x40	60x60	0,44	1,69	0,25	163	5	228
Infectado 5	40x40	60x60	0,44	1,66	0,25	249	5	364
Infectado 6	40x40	60x60	0,44	1,58	0,25	242	5	418

Parâmetros experimentais e resultados do número de blocos e do total de marcadores (ΣQ), obtidos pelo fracionador óptico, na estimativa de astrócitos na fissura hipocampal em todos os animais analisados. Área do bloco de contagem (a); área da matriz de contagem (A - X, Y); asf: área do bloco/área da matriz; tsf: altura do bloco/espessura da secção; ssf: secções contadas/total de secções.