



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NATALIE CHAVES FERREIRA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOLÓGICO DA ENCEFALITE
INDUZIDA PELO VÍRUS JURUAÇÁ EM MODELO MURINO**

BELÉM-PA

2013

NATALIE CHAVES FERREIRA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOLÓGICO DA ENCEFALITE
INDUZIDA PELO VÍRUS JURUAÇÁ EM MODELO MURINO**

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

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Picanço
Diniz Junior

BELÉM-PA

2013

NATALIE CHAVES FERREIRA

**ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNOLÓGICO DA ENCEFALITE
INDUZIDA PELO VÍRUS JURUAÇÁ EM MODELO MURINO**

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

BELÉM-PA, ____ de _____ de _____.

Banca examinadora:

Dr. José Antonio Picanço Diniz Junior (orientador)
Laboratório de Microscopia Eletrônica
Instituto Evandro Chagas

Dr^a. Jannifer Oliveira Chiang (membro)
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
Instituto Evandro Chagas

Dr^a. Karen Renata Matos Oliveira (membro)
Laboratório de Neuroendocrinologia
Universidade Federal do Pará

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

Dedico esta Dissertação de Mestrado a minha família, aos meus amigos e a todos que estiveram comigo em um dos momentos mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me acompanhar em todos os momentos da minha vida e por me ajudar a trilhar o meu caminho com força, coragem e sabedoria.

Agradeço a minha mãe pelo amor e carinho que dedicou a mim durante todos esses anos e por estar sempre ao meu lado me incentivando a correr atrás dos meus sonhos, sem desistir de tornar realidade cada um deles. Ao meu pai pela sua dedicação e apoio em todos os momentos que estamos juntos e por me ajudar a buscar o sucesso profissional e pessoal.

Aos meus avós pelo carinho extremo e pelos seus ensinamentos, que foram muito valiosos para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Aos meus tios e tias, cujos conselhos foram de grande importância nas decisões que tive de tomar ao longo da minha vida. Aos meus primos Adriano, Vinícius, Leandro, Manuela, Lara e outros por juntos me proporcionarem vários momentos de alegria, que ficarão sempre guardados na minha memória.

Agradeço a todos os meus amigos dos tempos de ensino médio, da graduação e agora do Mestrado, que me acompanham nos momentos de descontração e aflição e que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Sou grata também aos meus amigos e colegas do Instituto Evandro Chagas (IEC) pelo apoio em diversas situações do nosso dia-a-dia.

Ao meu orientador pela compreensão, paciência, atenção e dedicação em transmitir seus conhecimentos científicos, pelo incentivo a continuar persistindo até alcançar o meu objetivo e por me ensinar a não desistir diante das dificuldades que aparecem durante a realização de qualquer trabalho.

Agradeço a todo auxílio que foi prestado pelos estagiários e funcionários do IEC para que este trabalho pudesse ser concluído. À CAPES pelo apoio financeiro. À Universidade Federal do Pará e ao Instituto Evandro Chagas, onde descobri o meu caminho em Biomedicina e trabalhando com pesquisa envolvendo vírus e camundongos desde a iniciação científica até o momento atual do mestrado. E a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

“De tudo ficarão três coisas: a certeza de que estamos começando, de que é preciso continuar e de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Da queda, um passo de dança. Do medo, uma escada. Do sonho, uma ponte. Da procura, um encontro.”

Fernando Sabino

RESUMO

Muitos estudos têm sido realizados para o entendimento da neuropatogênese das encefalites virais a partir de trabalhos experimentais, porém, nenhum estudo experimental foi dedicado à compreensão da neuropatogênese de membros da família *Picornaviridae* isolados de morcegos na região amazônica. O vírus Juruacá, um desses agentes, parcialmente caracterizado como membro da família *Picornaviridae* por Araújo e colaboradores (2006), causou lesões no encéfalo de camundongos neonatos com presença de gliose reativa, apesar de não provocar efeito citopático (ECP) em cultivos primários de células do sistema nervoso central (SNC), sugerindo que este agente viral seja responsável pela morte dos animais devido a uma intensa resposta imune. O objetivo desse trabalho foi investigar a resposta imune no SNC e alterações celulares causadas pelo vírus Juruacá em camundongos albinos da linhagem BALB/c neonatos a partir de análises histopatológicas, de ativação microglial e da expressão de citocinas, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Para tanto, foram realizados processamento de amostras para histopatologia, ensaios imunoenzimáticos, imunohistoquímicos e de imunofluorescência, além de testes para quantificação de NO e ROS e análises estatísticas. Nossos resultados demonstraram que o vírus Juruacá induz lesões por todo o encéfalo, com maior intensidade no parênquima cortical. Os testes imunohistoquímicos demonstraram a presença de antígenos virais e de micróglia reativa distribuídos por todo o encéfalo e região anterior da medula espinhal. Micróglia com aspecto amebóide, demonstrando intensa ativação, foram observadas principalmente no córtex cerebral, bulbo olfatório, núcleo olfatório anterior, prosencéfalo e diencéfalo próximo ao ventrículo lateral. A produção das citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4) diminuiu ao longo do tempo, enquanto que as pró-inflamatórias (IL-12, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) aumentaram significativamente a partir do 8º dia. Os ensaios para detecção de ROS demonstraram grande produção de radicais superóxido desde o 4º dia, já a produção de NO foi sempre menor nos animais infectados. Provavelmente, a ativação das células gliais, principalmente micróglia, e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias e ROS promoveram uma ação devastadora sobre as células do SNC, que coincide com a intensificação dos sinais clínicos. Diante do exposto, ficou evidente que os nossos resultados indicam que o vírus Juruacá é responsável por uma doença de curso inflamatório que leva a óbito 100% de camundongos neonatos infectados.

Palavras-chave: Resposta imune. Vírus Juruacá. Citocinas. Óxido nítrico. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Many studies have been conducted to understand the neuropathogenesis of viral encephalitis from experimental work, however, no experimental studies have been devoted to understanding the neuropathogenesis of members of the *Picornaviridae* family isolated from bats in the Amazon region. The Juruaça virus, one of these agents, partially characterized as a member of the *Picornaviridae* family by Araujo et al. (2006), caused lesions in the brain of neonatal mice with reactive gliosis presence, although not cause cytopathic effect (CPE) in primary cultures of central nervous system (CNS) cells, suggesting that this viral agent is responsible for the death of animals due to an intense immune response. The aim of this study was to investigate the immune response in the CNS and cellular changes caused by Juruaça virus in newborn albino mice of strain BALB/c from histopathological analysis, microglial activation, and expression of cytokines, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). Thus, we performed sample processing for histopathology, immunosorbent assay, immunohistochemical and immunofluorescence assays, tests to quantify NO and superoxide radicals, and statistical analysis. Our results demonstrated that the Juruaça virus induces lesions throughout the brain, with greater intensity in the cortical parenchyma. Immunohistochemical tests showed the presence of viral antigens and reactive microglia distributed throughout the brain and anterior spinal cord. Microglia with amoeboid shape, demonstrating intense activation, were observed in the cerebral cortex, olfactory bulb, anterior olfactory nucleus, midbrain and forebrain near the lateral ventricle. The production of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-4) decreased over time, whereas pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-6, IL-1 β , TNF- α and IFN- γ) increased significantly from the 8th day. Assays for ROS detection showed great superoxide radicals production from the 4th day, as NO production was always lower in the infected animals. Probably, activation of glial cells, especially microglia, and subsequent production of proinflammatory cytokines and ROS promoted a devastating action on the cells of the CNS, which coincides with the intensification of clinical signs. In accordance with what has been explained above, became evident that our results indicate that the Juruaça virus is responsible for a imprint inflammatory disease that leads to death 100% of infected neonates mice.

Keywords: Immune response. Juruaça virus. Cytokines. Nitric oxide. Reactive oxygen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática do genoma de Enterovírus.	23
Figura 2 –	Representação esquemática do capsídeo icosaédrico de picornavírus do gênero <i>Cardiovirus</i> .	24
Figura 3 –	Estratégia da Replicação do Poliovírus, membro da família <i>Picornaviridae</i> .	25
Figura 4 –	Figura esquemática das células do SNC.	26
Figura 5 –	Análise estatística da perda de peso de camundongos albinos da linhagem BALB/c durante 12 dias de infecção com o vírus Juruaça.	61
Figura 6 –	Análise estatística da perda de peso de camundongos albinos da linhagem BALB/c no 4º, 8º e 12º d.p.i. do vírus Juruaça.	62
Figura 7 –	Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A) e grupo infectado com o vírus Juruaça (B, C e D) no 4º d.p.i. coradas por hematoxilina eosina (HE).	63
Figura 8 –	Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A) e grupo infectado com o vírus Juruaça (B, C e D) no 8º d.p.i. coradas por hematoxilina eosina (HE).	64
Figura 9 –	Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A) e grupo infectado com o vírus Juruaça (B, C, D, E, F, G e H) no 12º d.p.i. coradas por hematoxilina eosina (HE).	65

Figura 10 –	Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A e B) e grupo infectado com o vírus Juruaça (C, D, E e F) no 8º d.p.i. marcadas com anticorpo anti-Juruaça por imunohistoquímica.	67
Figura 11 –	Fotomicrografia de secção histológica do encéfalo de camundongos infectados com o vírus Juruaça no 12º d.p.i. corada por imunohistoquímica, mostrando uma visão panorâmica da distribuição de micróglia pelas diversas regiões encefálicas.	68
Figura 12 –	Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle e grupo infectado com o vírus Juruaça no 12º d.p.i. marcadas com Iba-1 por imunohistoquímica.	69
Figura 13 –	Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos infectados com o vírus Juruaça no 12º d.p.i. marcadas com Iba-1 por imunohistoquímica.	70
Figura 14 –	Análise estatística da produção da citocina IL-12p40 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruaça.	71
Figura 15 –	Análise estatística da produção da citocina IL-6 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruaça.	72
Figura 16 –	Análise estatística da produção da citocina TNF- α no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruaça.	73

Figura 17 –	Análise estatística da produção da citocina IFN- γ no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá.	73
Figura 18 –	Análise estatística da produção da citocina IL-1 β no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá.	74
Figura 19 –	Análise estatística da produção da citocina IL-10 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá.	75
Figura 20 –	Análise estatística da produção da citocina IL-4 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá.	75
Figura 21 –	Análise estatística da quantificação de nitrito para detecção de NO no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá.	76
Figura 22 –	Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcção de isolectina B ₄ conjugada com FITC em micróglia do grupo controle (verde), ausência de marcação para antígenos virais e coloração de núcleos celulares com corante azul Hoechst 33258.	78
Figura 23 –	Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcção de isolectina B ₄ conjugada com FITC em micróglia infectadas (verde), marcação de antígenos virais (vermelho) e coloração de núcleos celulares com corante azul Hoechst 33258.	78

- Figura 24 – Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcaçãõ de GFAP em astrócitos do grupo controle (verde), ausência de marcaçãõ de antígenos virais e coloraçãõ de núcleos celulares com corante azul Hoecsht 33258. 79
- Figura 25 – Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcaçãõ de GFAP em astrócitos infectados (verde), marcaçãõ de antígenos virais (vermelho) e coloraçãõ de núcleos celulares com corante azul Hoecsht 33258. 79
- Figura 26 – Micrografia de fluorescência de culturas de oligodendrócitos no 8º d.p.i., mostrando imunomarcaçãõ de CNPase em oligodendrócitos (verde) e coloraçãõ de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio. 80
- Figura 27 – Micrografia de fluorescência de culturas de oligodendrócitos no 8º d.p.i., mostrando ausência de marcaçãõ de antígenos virais em oligodendrócitos do grupo controle (verde) e coloraçãõ de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio. 80
- Figura 28 – Micrografia de fluorescência de culturas de oligodendrócitos no 8º d.p.i., mostrando imunomarcaçãõ de antígenos virais em oligodendrócitos infectados (verde) e coloraçãõ de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio. 81
- Figura 29 – Micrografia de fluorescência de culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcaçãõ de iNOS em co-cultura de células gliais e neurônios embrionários não infectada (verde) e coloraçãõ de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio. 81

Figura 30 –	Micrografia de fluorescência de culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcção de iNOS em co-cultura de células gliais e neurônios embrionários infectada (verde) e coloração de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio.	82
Figura 31 –	Fotomicrografia de campo claro demonstrando a detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários não infectadas (A) e infectadas (B), no 4º d.p.i.	83
Figura 32 –	Análise estatística da detecção de ROS a partir da quantificação do produto da reação em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários de camundongos albinos da linhagem BALB/c analisadas após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá.	83
Quadro 1 –	Resumo dos resultados relacionados ao peso dos animais, sinais clínicos e à produção de citocinas, NO e ROS.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AVE: Acidente vascular encefálico
- BHE: Barreira hematoencefálica
- CBA: *Citometric Bead Array Set System*
- CC: Caquexia cancerosa
- cDNA: DNA complementar
- Células HEK-293: Células *Human embryonic Kidney-293* (Células embrionárias humanas de rim-293)
- Células HeLa: Células cancerosas de Henrietta Lacks
- Células NK: Células natural killer
- CEUA: Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais
- cNOS: Óxido nítrico sintase constitutiva
- CO₂: Dióxido de carbono
- CpG: Citosina- fosfato- guanina
- d.p.i.: dias após inoculação
- DL₅₀/0,02mL: Dose letal para 50% dos camundongos infectados por 0,02 mililitros
- DMEM/F12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12*
- DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica
- Duox1: NADPH dupla oxidase 1
- Duox2: NADPH dupla oxidase 2
- EAE: Encefalomielite alérgica experimental
- ECP: Efeito citopático
- EH: Encefalite herpética
- ELISA: *Linked Immunosorbent Assay*
- EM: Esclerose múltipla
- EPCs: Equipamentos de proteção coletiva
- EPIs: Equipamentos de proteção individual
- EV71: Enterovírus 71
- FG: Fator de crescimento
- GFAP: *Glial fibrillary acidic protein* (Proteína glial fibrilar ácida)
- GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
- H-1PV: Parvovírus humano 1
- H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HBSS: Solução salina balanceada de Hank's

HCl: Ácido clorídrico

HIV 1: Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HSV-1: Vírus herpes simples tipo 1

i.c.: Inoculação intracerebral

i.p.: Inoculação intraperitoneal

IEC: Instituto Evandro Chagas

IFI: Imunofluorescência Indireta

IFNs: Interferons

IFN- α : Interferon- α

IFN- β : Interferon- β

IFN- γ : Interferon- γ

IgE: Imunoglobulina E

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-17: Interleucina-17

IL-18: Interleucina-18

IL-1 α : Interleucina-1 α

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

LDRL: Receptor de lipoproteínas de baixa densidade (*Low density lipoprotein cholesterol*)

LPS: Lipopolissacarídeos

LTC: Linfócito T citotóxico

M.O.M.: *Mouse on Mouse*

MCSF: Fator estimulador de colônia de macrófagos

MHC I: Complexo principal de histocompatibilidade I

MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade II

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH: Hidróxido de sódio

NBT: *Nitroblue Tetrazolium*

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOX: NADPH oxidase

Nox1: NADPH oxidase 1

Nox2: NADPH oxidase 2

Nox3: NADPH oxidase 3

Nox4: NADPH oxidase 4

Nox5: NADPH oxidase 5

O⁻²: ânion superóxido

OH⁻: Radical hidroxila

P1: Proteína precursora estrutural 1

P2: Proteína precursora estrutural 2

P3: Proteína precursora estrutural 3

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

pDCs: Células dendríticas plasmocitóides

PG: Prostaglandinas

pH: Potencial hidrogeniônico

ROS: *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

RRP: Receptores de reconhecimento de padrão

RT-PCR: Reação em cadeia de polimerase - transcriptase reversa

SBF: Soro Bovino Fetal

SAARB: Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

SNC: Sistema Nervoso Central

TGF-β: Fator de crescimento tumoral-β

TLR 2: Receptores semelhantes ao Toll 2

TLR 3: Receptores semelhantes ao Toll 3

TLR 7: Receptores semelhantes ao Toll 7

TLR 8: Receptores semelhantes ao Toll 8

TLR 9: Receptores semelhantes ao Toll 9

TLR: *Toll like receptors* (Receptores semelhantes ao Toll)

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF-RI: Receptor I de TNF
TNF-RII: Receptor II de TNF
TNF- α : Fator de necrose tumoral- α
UTRs: *Untranslated regions* (regiões não traduzidas)
VCML: Vírus da coriomeningite linfocítica
VDB: Vírus da doença de Borna
VDPM: Vírus da doença de pé e mão
VEJ: Vírus da encefalite japonesa
VEMC: Vírus da encefalomio-cardite
VEMT: Vírus da encefalomielite murina de Theiler
VEVI: Vírus da estomatite vesicular indiana
VLM: Vírus da leucemia murina
VP0: *Virion protein 0* (proteína viral 0)
VP1: *Virion protein 1* (proteína viral 1)
VP2: *Virion protein 2* (proteína viral 2)
VP3: *Virion protein 3* (proteína viral 3)
VP4: *Virion protein 4* (proteína viral 4)
VPg: *Virion protein genome* (proteína genômica do virion)
VSIN: Vírus Sindbis
VSV: Vírus da estomatite vesicular
VV: Vírus vaccínia
ZSV: Zona subventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	FAMÍLIA <i>PICORNAVIRIDAE</i>	21
1.1.1	Características primárias e secundárias dos Picornavírus.....	22
1.2	CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	26
1.3	PATOGENIA DA INFECÇÃO VIRAL.....	31
1.3.1	Neuroinvasão.....	31
1.3.2	Aspectos clínicos e morfológicos.....	32
1.3.3	Resposta imune à infecção viral.....	34
1.3.4	Resposta imune no SNC.....	37
1.3.5	Citocinas.....	38
1.3.6	Óxido nítrico (NO).....	43
1.3.7	Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	45
2	JUSTIFICATIVA.....	47
3	OBJETIVOS.....	48
3.1	OBJETIVO GERAL.....	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....	49
4.2	CEPAS VIRAIS.....	49
4.3	ANIMAIS.....	49
4.4	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	50
4.4.1	Produção de estoque viral.....	50
4.4.2	Titulação do estoque viral.....	50
4.4.3	Pesagem dos animais.....	50
4.4.4	Processamento histopatológico.....	51
4.4.5	Produção de soro homólogo.....	51
4.4.6	Processamento imunohistoquímico.....	52
4.4.6.1	Fixação por perfusão e microtomia.....	52
4.4.6.2	Imunohistoquímica.....	52
4.4.7	Testes para detecção de citocinas e NO.....	53
4.4.7.1	Preparo do homogeneizado de cérebro de camundongos.....	53
4.4.7.2	Ensaio imunoenzimático (ELISA do tipo sandwich).....	53

4.4.7.3	Citometria de fluxo.....	54
4.4.7.4	Reagente de Griess para quantificação de nitrito.....	54
4.5	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	55
4.5.1	Cultivos primários.....	55
4.5.1.1	Cultura primária de células gliais.....	55
4.5.1.2	Cultura de neurônios embrionários.....	56
4.5.1.3	Co-cultura de células gliais e neurônios embrionários.....	56
4.5.1.4	Cultura de oligodendrócitos.....	57
4.5.2	Inoculação do vírus em cultivos primários.....	57
4.5.3	Imunofluorescência indireta (IFI).....	57
4.5.4	Detecção de radicais superóxido e em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários.....	58
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	60
5.1.1	Susceptibilidade dos camundongos e titulação viral.....	60
5.1.2	Peso dos animais.....	60
5.1.3	Análise histopatológica e aspectos morfológicas da reação microglial.....	62
5.1.4	Produção de citocinas.....	71
5.1.5	Produção de óxido nítrico (NO).....	76
5.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	77
5.2.1	Detecção de marcadores de células gliais, antígenos virais e iNOS.....	77
5.2.2	Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	82
6	DISCUSSÃO.....	85
6.1	PATOGÊNESE.....	85
6.2	RESPOSTA IMUNE NO SNC	89
7	CONCLUSÃO.....	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
	ANEXOS.....	132
	ANEXO A.....	132
	ANEXO B.....	133
	ANEXO C.....	134

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho é dedicado a investigar uma espécie de vírus da família *Picornaviridae*, que causa infecção e morte em camundongos neonatos, mas não em adultos. É, portanto, relevante conceituarmos preliminarmente esse agente patológico. Da literatura há um conjunto de definições diferentes de interesse para o presente trabalho:

“...Vírus são pequenos parasitas intracelulares obrigatórios, que por definição contêm ou um genoma de RNA ou de DNA circundado por uma proteção, um revestimento de proteína codificado pelo vírus. Os vírus podem ser vistos como elementos genéticos móveis, mais provavelmente de origem celular e caracterizados por uma longa co-evolução do vírus e do hospedeiro...” (GELDERBLUM, 1996).

“...O vírus é um biosistema elementar que possui algumas propriedades de sistemas vivos, tais como um genoma e capacidade de adaptação às mudanças ambientais...” (VAN REGENMORTEL, 2000).

“...Os vírus são os menores de todos os organismos que se replicam e, historicamente, são caracterizados pela sua habilidade de passar por filtros que conseguem reter as menores bactérias...” (CONDIT, 2007).

“...Os vírus são considerados partículas passíveis de subsistirem extracelularmente, que têm a capacidade de penetrar na célula e modificar os processos metabólicos normais da mesma, recodificando-os para a sua própria replicação...” (HARRISON, 2007).

“...Os vírus são entidades físicas reais produzidas pela evolução biológica e genética...” (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA VIRAL, 9th report, 2009).

“...Vírus são montagens macromoleculares metaestáveis compostos por genoma viral incluído no capsídeo protéico...” (PRASAD; SCHMID 2012).

“...Os vírus não são mais confundidos com os seus virions, mas podem ser vistos como seres vivos complexos que transformam a célula infectada em um novo organismo – o vírus – capaz de produzir virions...” (FORTERRE, 2010).

Esta última definição trás um conceito único e interessante que torna o vírus a reunião dos constituintes virais e a célula infectada. Portanto, até o presente não há um consenso para a definição de vírus.

No contexto desse trabalho, vamos considerá-lo como um agente biológico capaz de infectar células e utilizar a maquinaria de síntese (transcrição e tradução) para sua replicação e manutenção, provocando alterações metabólicas e danos ao organismo hospedeiro.

Ao longo dos últimos 58 anos, o Instituto Evandro Chagas (IEC) acompanha o desenvolvimento da virologia e, nesse período, isolou e identificou inúmeros arbovírus e outros vírus, a partir de amostras biológicas de humanos, outros vertebrados e invertebrados capturados na Amazônia e em outras regiões brasileiras. O Juruaçá foi isolado pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do IEC em camundongo (*Mus musculus*) albino suíço recém nascido por inoculação intracerebral (i. c.) de homogeneizado das vísceras de um morcego, capturado em 17 de junho de 1982 na região de Porto Trombetas, município de Oriximiná, Pará (ARAÚJO, 2006).

Os vírus em sua grande maioria são responsáveis por doenças de evolução benigna, sem levar a morte ou incapacidade (HALSTEAD, 1988; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998; VIANNA et al., 2002), entretanto alguns arbovírus, além de outros agentes virais, podem causar síndrome febril, febre com exantema, doenças hemorrágicas e encefalites (BELLINI et al., 2005; CHU et al., 2002; DIAMOND et al., 2009; GOH et al., 2000; LALIVE et al., 2011; MANSFIELD et al., 2009; MISRA et al., 2008; PINHEIRO et al., 1986; SAPKAL et al., 2009; SOLOMON, 2004; SOLOMON et al., 2007; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1982; VASCONCELOS et al., 1991).

As encefalites virais são de grande relevância tanto para a investigação científica quanto para o manejo médico-sanitário, já que estão associadas a uma alta taxa de morbimortalidade, além de ser de difícil controle. Dentre os numerosos pontos que permitem um melhor entendimento sobre as encefalites virais, destacam-se as diferentes localizações das lesões e os diversos tipos celulares envolvidos no processo patológico.

Muitos são os vírus causadores de doença neurológica ao homem, dentre eles podemos citar os membros da família *Togaviridae*, como o vírus da encefalite equina leste (COOPER; SCOTT 2000), vírus da encefalite equina oeste (WEAVER et al., 1997) e vírus da encefalite equina venezuelana (RICO-HESSE et al., 1995); *Flaviviridae*, como o vírus do Nilo ocidental (CAMPBELL et al., 2002), vírus da encefalite Saint Louis (MONATH et al., 1980) e vírus da encefalite japonesa (SOLOMON et al., 2004); *Rhabdoviridae*, como o vírus da raiva (WILLOUGHBY et al., 2005); *Retroviridae*, como o vírus da imunodeficiência humana 1, vírus da imunodeficiência humana 2 (SOUSA et al., 2002) e vírus T-linfotrópico humano 2 (SHINDO et al., 2002); *Herpesviridae*, como Varicella-zoster (GILDEN et al., 2000), vírus Herpes simples (BLOOM et al., 2010), vírus Epstein-Barr (JEFFREY; COHEN 2000) e

citomegalovirus (SILVA, J., 2010); e *Picornaviridae*, como o Poliovirus (BELOV et al., 2010), Cocksackievirus (YUAN et al., 2010) e Echovirus (MAO et al., 2010).

Um grande número de estudos tem sido dedicado ao entendimento da neuropatogênese das encefalites virais a partir de trabalhos experimentais (FAZAKERLEY, 2004; JACKSON et al., 2001; REMPEL et al., 2004; SAHA et al., 2006) e outros tantos foram realizados para identificação de infecções virais em morcegos, animais com características únicas que tornam esse mamífero um dos principais reservatórios naturais e veículos de disseminação viral (LAU et al., 2005, 2010a, 2010b, 2011; LI, L. et al., 2010; WOO et al., 2006, 2007); porém, nenhum estudo experimental foi realizado sobre a neuropatogênese de membros da família *Picornaviridae* isolados de morcegos na região amazônica (ARAÚJO, 2006).

1.1 FAMÍLIA *PICORNAVIRIDAE*

A família *Picornaviridae* compreende os menores vírus de RNA conhecidos e é uma das maiores e mais importantes famílias de patógenos que causam doenças em humanos e animais, como a poliomielite, resfriado comum, a doença de pé e mão – febre aftosa –, além de doenças respiratórias, cardíacas, hepáticas, neurológicas, mucocutâneas e sistêmicas com diferentes níveis de severidade (BEDARD; SEMLER 2004; DE PALMA et al., 2008; LAU et al., 2010a; MURRAY et al., 2006; RACANIELLO, 2007; RUECKERT, 1996). Os picornavírus apresentam um papel importante no desenvolvimento da virologia moderna. O vírus da doença de pé e mão (VDPM), por exemplo, foi o primeiro vírus animal a ser descoberto, por Loeffler e Frosch em 1898. Os poliovírus foram isolados 10 anos depois, uma descoberta importante para a epidemia de poliomielite na década de 20 (BELSHAM; NORMAN 2008; DE PALMA et al., 2008; RACANIELLO, 2007; TUTHILL et al, 2010).

As doenças causadas pelos vírus dessa família são caracterizadas por um determinado conjunto de sintomas (síndrome), que podem estar correlacionados com infecção em tecidos específicos (tropismo celular). Por exemplo, os poliovírus infectam células nasofaríngeas e do intestino, usando-as para se propagar na natureza. A forma paralítica do poliovírus também tem alta especificidade pelas células do corno anterior da medula espinhal, contribuindo para as características paralíticas especiais da doença. Os mecanismos responsáveis pelo tropismo celular não estão totalmente esclarecidos. Há inúmeros relatos de infecções abortivas ou restritas, nas quais o RNA viral sofre desnudamento com sucesso, inicia uma infecção, mas é interrompido em uma etapa crítica do ciclo de replicação. Isso demonstra a necessidade de moléculas celulares específicas na multiplicação dos picornavírus, que poderiam estar

envolvidas na função de proteinase viral ou de proteínas virais na síntese do seu RNA (BEDARD; SEMLER 2004, LIPTON et al., 2006; RUECKERT, 1996; TUTHILL et al., 2010).

Atualmente, a família *Picornaviridae*, está dividida em dezessete gêneros, que são diferenciados por características genéticas, biofísicas e biológicas: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicpivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Parechovirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus*, *Tremovirus*, dos quais, até o momento, quatro apresentam vírus que são patogênicos para o homem (*Enterovirus*, *Parechovirus*, *Kobuvirus* e *Hepatovirus*) (ANEXO A) (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA VIRAL, 9th report, 2009, 2012).

1.1.1 Características primárias e secundárias dos picornavírus

Os picornavírus são esféricos e apresentam diâmetro de 22-30 nm; possuem RNA de fita simples, contínua, linear e de polaridade positiva – que constitui diretamente um RNAm para a síntese de suas proteínas virais – de aproximadamente 7000 a 8500 nucleotídeos; têm simetria icosaédrica; não são envelopados; podem ou não possuir hemaglutinina; são rapidamente inativados pela luz ultravioleta; infectam uma variedade de tipos celulares de origem humana e animal; e, dependendo do gênero, podem ou não ser estáveis em pH ácido, o que influencia no sítio de replicação do vírus (DRESCHERS et al., 2007; GARRIGA et al., 2012; RACANIELLO, 2007; RUECKERT, 1996; TUTHILL et al., 2010, WANG, S-M. et al., 2012).

O genoma dos picornavírus apresenta a extremidade 5' ligada a um pequeno peptídeo denominado VPg (proteína genômica do virion [virion protein genome]) e a 3' é poliadenilada, apresentando em ambas as extremidades regiões não traduzidas (UTRs [untranslated regions]), as quais têm papel importante no início da transcrição, já que formam o sítio de entrada dos ribossomos (RUECKERT, 1996; PEREIRA; GONÇALVES, 2003; DE PALMA et al., 2008; TUTHILL et al., 2010). A região codificadora é dividida em três unidades – P1, P2 e P3 – e possui 11 genes traduzidos em uma poliproteína, que é posteriormente clivada em proteínas maduras, dando origem a três proteases virais – 2A, 3C e 3CD – e às proteínas estruturais envolvidas, por exemplo, na alteração do ambiente celular para otimizar a replicação e diretamente na multiplicação do vírus (BELSHAM; NORMAN 2008; DE PALMA et al., 2008; LIPTON et al., 2006; MURRAY et al., 2006; PATHAK et al., 2007; TUTHILL et al., 2010).

A proteína precursora estrutural (P1) dos picornavírus possui 90 kD e é proteoliticamente processada pela protease 3C em proteínas estruturais do vírus denominadas de VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo encontradas no capsídeo viral (Figura 1) (PATHAK et al., 2007; RUECKERT, 1996; TUTHILL et al., 2010).

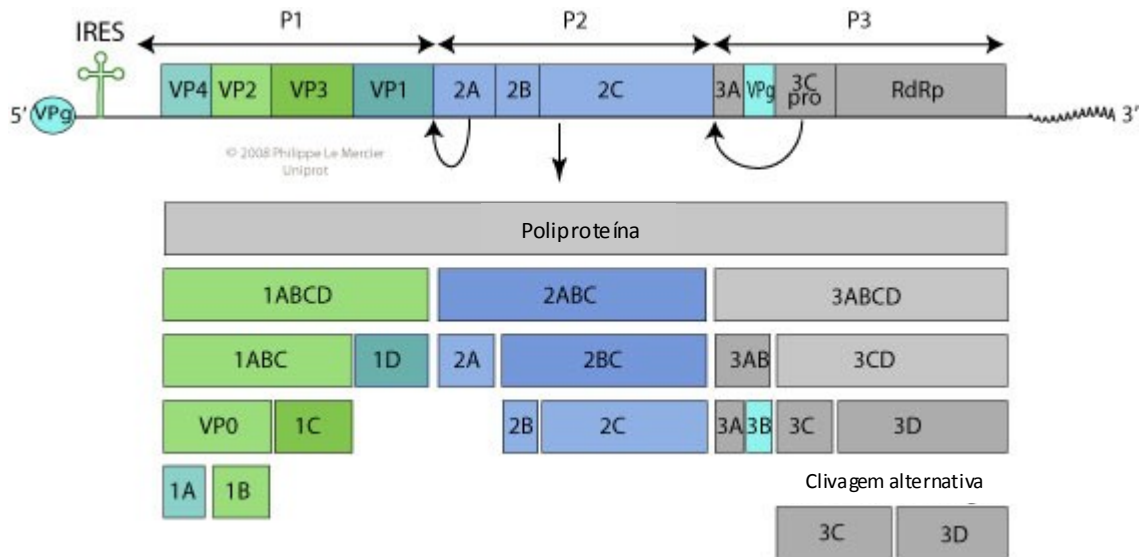


Figura 1 – Representação esquemática do genoma de Enterovírus. (Fonte: disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/99.html).

A montagem do virion no citoplasma tem início com a associação das proteínas VP0 (formada pela VP2 e VP4), VP1 e VP3, formando um complexo iniciador com coeficiente de sedimentação 5S. Cinco dessas estruturas 5S se unem para dar origem a um pentâmero de 14S, e 12 desses pentâmeros formam o capsídeo completo com 70S, que envolve o RNA genômico e completa a partícula viral de 140S (Figura 2). As VP de 1 a 3 são necessárias para conferir a forma icosaédrica do capsídeo dos picornavírus, enquanto que a VP4 está presente na superfície interna do capsídeo viral (RACANIELLO, 2007; TUTHILL et al., 2010).

As proteínas VP1, VP2 e VP3 têm uma estrutura básica semelhante, que consiste em oito cadeias β preguiadas ligadas por alças de comprimentos variados. O comprimento e a composição das ligações, juntamente com a posição inclinada das cadeias β , determinam a topologia da superfície das partículas virais e são responsáveis pela especificidade de ligação ao receptor e pelas características antigênicas (MURRAY et al., 2006; PATHAK et al., 2007; TUTHILL et al., 2010).

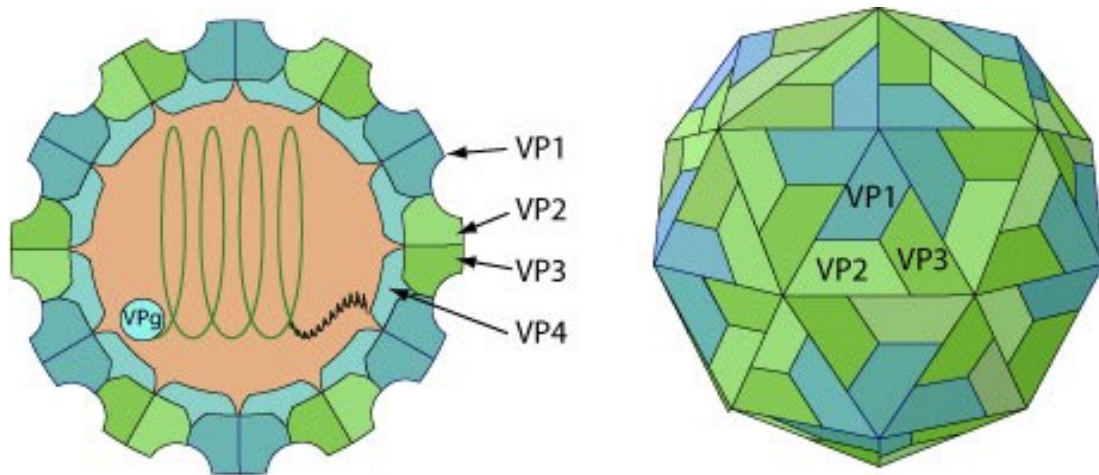


Figura 2 – Representação esquemática do capsídeo icosaédrico de picornavírus do gênero *Cardiovirus* (Fonte: disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/99.html).

Os receptores são essenciais para a entrada do vírus na célula hospedeira; no caso dos picornavírus, estão envolvidos no ataque à célula, sinalização e endocitose. Os receptores usados para reconhecê-los incluem os membros da família semelhantes a imunoglobulinas, da família de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), da família das moléculas de adesão celular – integrina – e da família dos receptores com domínios semelhantes aos de imunoglobulinas de células T (MURRAY et al., 2006; TUTHILL et al., 2010; TRIANTAFILOU et al., 2001; UPLA et al., 2004).

Alguns vírus conseguem passar diretamente pela membrana plasmática, mas estudos recentes sugerem que esta via não é normalmente utilizada. Os picornavírus são reconhecidos por uma variedade de receptores na superfície celular, mas sua entrada no citoplasma ocorre por meio de vesículas endossomais (BRABEC et al., 2003, BRANDENBURG et al., 2007; BERKA et al., 2009), necessitando de um complexo receptor/co-receptor na superfície da célula para interagir com os sítios de ligação, induzir a endocitose e iniciar o desencapsulamento do vírus (TUTHILL et al., 2010).

Após entrar na célula, os vírus da família *Picornaviridae* liberam seu RNA genômico. Esse processo tem sido amplamente estudado, mas os mecanismos envolvidos ainda não foram detalhados. Acredita-se que o desencapsulamento ocorre concomitantemente com o mecanismo de permeabilização das membranas endossomais para liberar o RNA viral, já que o lúmen dos endossomos é um ambiente hostil, provocando alterações na estrutura do capsídeo. Dessa forma, esses vírus alcançam o citoplasma e dão início ao processo infeccioso na célula hospedeira (GARRIGA et al., 2012; TUTLHILL et al., 2010).

Para sair da célula hospedeira, os vírus não envelopados, como os picornavírus – vírus da encefalomyelite murina de Theiler (VEMT) e poliovírus, por exemplo –, podem provocar

lise celular ou utilizar os mecanismos de autofagia e serem liberados por exocitose, evitando a destruição celular (KIRKEGAARD, 2009; ROUSSARIE et al., 2007a; TAYLOR et al., 2009) (Figura 3).

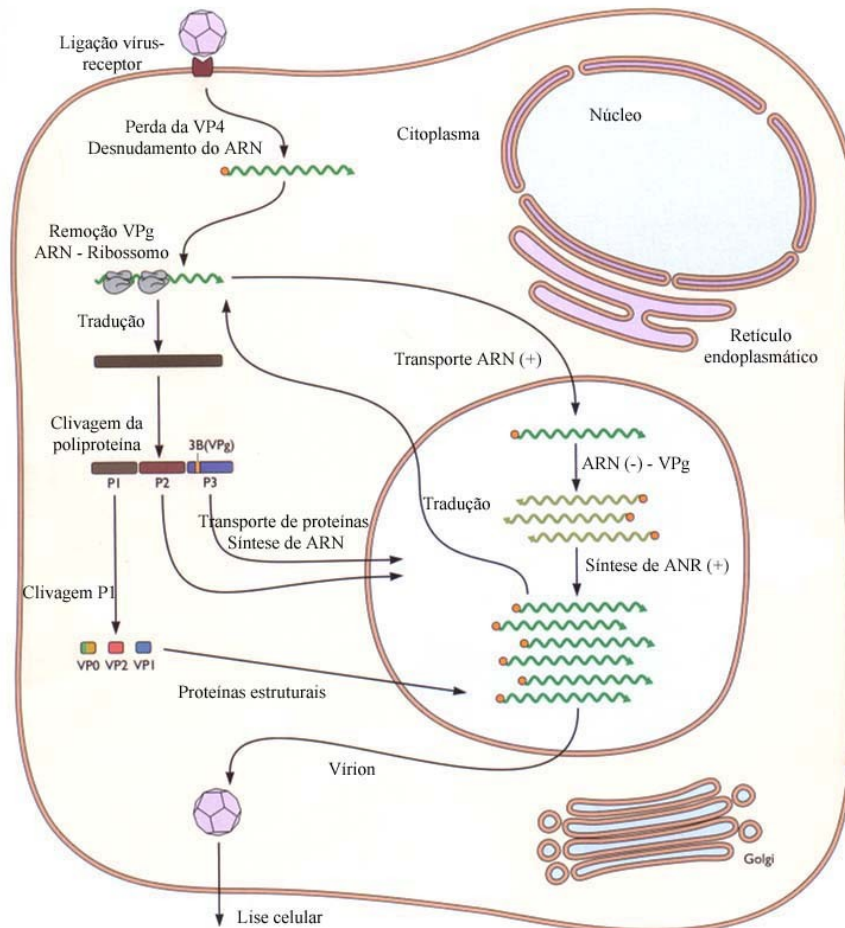


Figura 3 – Estratégia da Replicação do Poliovírus, membro da família *Picornaviridae*. Fonte: Adaptado de FLINT et al., 2000.

De acordo com Araújo (2006), as partículas virais do vírus Juruáçá (BE AN 401933) foram encontradas em sobrenadantes de culturas primárias de astrócitos, apresentando formato esférico com diâmetro de 23 a 30nm. A análise microscópica de cortes ultrafinos de cérebro de camundongos infectados com o vírus em questão mostrou partículas virais a partir do 4º dia após inoculação (d.p.i.) no citoplasma das células desses animais, sem a presença de envelope viral.

A técnica de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gênero *Enterovirus* correspondentes à região 5' não traduzida do genoma do *Poliovirus* – uma região extremamente conservada – permitiu observar o anelamento dos fragmentos de

cDNA do vírus Juruá nessas iniciadoras de *Poliovirus*. A partir das análises ultraestruturais e moleculares foi possível indicar uma classificação taxonômica preliminar para esse vírus na família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus* (ARAÚJO, 2006).

1.2 CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O SNC é composto por células excitáveis, chamadas neurônios, e por tipos especiais de células de suporte, as células gliais ou neurogliais. A interação entre elas é responsável por diversas funções no processamento de informações, garantindo a funcionalidade cerebral e o desenvolvimento do SNC (BRODAL, 2010; KANDEL, 1991; LENT, 2001; SNELL, 2003) (Figura 4).

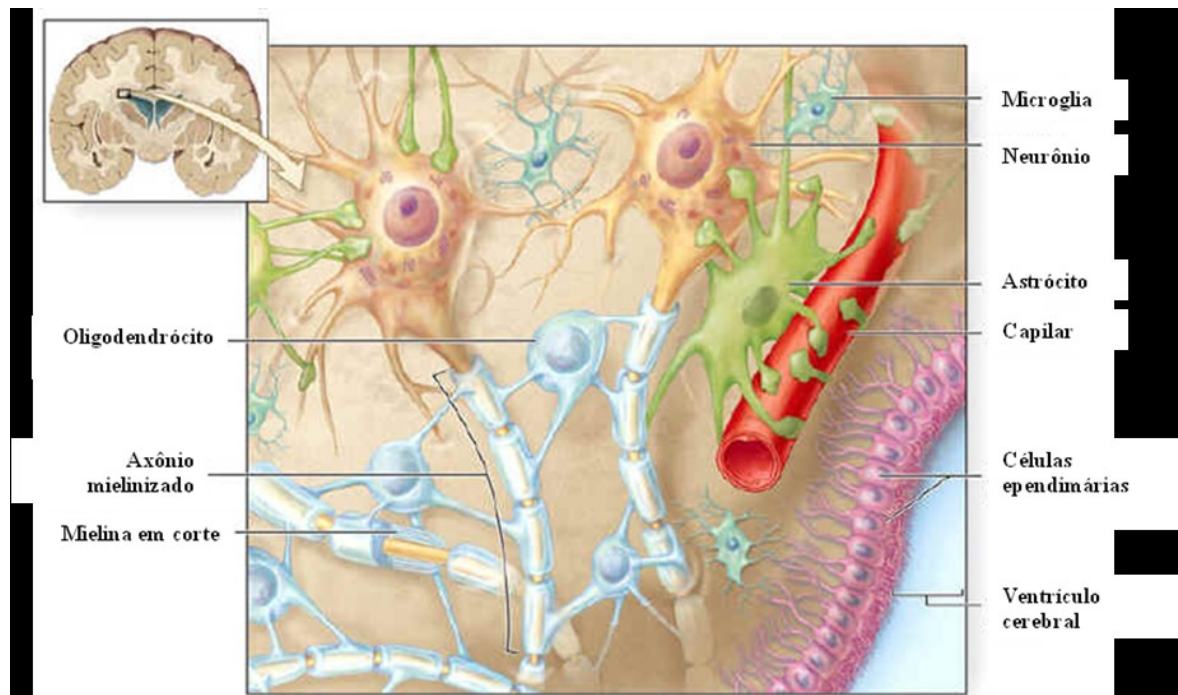


Figura 4 – Figura esquemática das células do SNC. Fonte: disponível em: http://www.picstopin.com/600/c%C3%A9lulas-gliais/http:%7C%7Cwww*medpix*med*br%7Cimgs%7CCelulas-gliais-1*.jpg/

Os neurônios são os componentes estruturais básicos e funcionais do SNC responsáveis pela recepção, produção e condução do impulso nervoso, com habilidade de decodificar o que se passa no ambiente externo e no interior do corpo (BRODAL, 2010; GARTNER et al, 1999; LENT, 2001). Variam consideravelmente de tamanho e forma, mas cada um tem um corpo celular no qual se encontra a maioria das organelas e de cuja superfície receptora projetam-se múltiplos dendritos, que recebem as informações e as envia ao corpo de

outros neurônios; e ainda um axônio, que são prolongamentos especialmente construídos com a finalidade de conduzir o impulso nervoso para o corpo celular de várias outras células (BRODAL, 2010; SNELL, 2003).

São caracterizados pela sua habilidade de responder a estímulos com uma descarga elétrica – impulso nervoso – e pela condução rápida desse impulso por longas distâncias. Dessa forma, os sinais podem ser transmitidos em milissegundos de um lugar para outro, dentro do SNC ou entre este e os órgãos de outros sistemas do corpo (BRODAL, 2010; SNELL, 2003).

O nome “glia” deriva da noção de que células gliais serviam como um tipo de cola – do inglês “glue” –, mantendo os neurônios unidos. As neuroglias foram inicialmente designadas como células passivas que promovem somente o suporte estrutural dos neurônios. Esse papel puramente estrutural da neuroglia foi abandonado a partir da descoberta de suas múltiplas funções na regulação e defesa do sistema nervoso (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; BRODAL, 2010; LEE et al., 2001; OBERHEIM et al., 2012; RIO HORTEGA, 1921).

As neuroglias são menores que os neurônios e representam a maior parte do volume total do encéfalo e da medula espinhal, podendo ser distinguidas dos neurônios pela morfologia (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; BRODAL, 2010; SNELL, 2003). As neuroglias normalmente são divididas em oligodendrócitos, astrócitos, ependimócitos e micróglias; cada um desses tipos celulares é estruturalmente e funcionalmente diferente um do outro (BRODAL, 2010; KIMELBERG; NORENBURG 1989; LEE et al., 2001, RODRÍGUEZ; VERKHRAATSKY 2011).

Os oligodendrócitos possuem corpo celular pequeno com poucos prolongamentos, citoplasma e núcleo com densidade maior que a dos astrócitos e um grande número de microtúbulos nos seus prolongamentos que podem estar envolvidos na sua estabilidade; além de não possuírem filamentos intermediários e glicogênio no citoplasma (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; BRODAL, 2010; DALLAS et al., 2006; KIMELBERG; NORENBURG 1989; LIU et al., 2007).

O oligodendrócito passa por muitos estágios de desenvolvimento até a sua maturação, que ocorre no período pós-natal inicial com a formação da bainha de mielina na substância cinzenta do cérebro de mamíferos (BAUMANN; PHAM-DINH 2001). Seus precursores originam-se de células neuroepiteliais e são encontrados nas zonas ventriculares nos primeiros estágios da vida embrionária (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; CURTIS et al., 1988; HARDY, 1991, 1993). Células progenitoras também são encontradas na zona subventricular

(ZSV) de mamíferos e podem dar origem a oligodendrócitos e astrócitos (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; LEVISON; GOLDMAN 1993).

A bainha de mielina é uma extensão da membrana plasmática de oligodendrócitos que reveste em várias camadas os axônios. Essa estrutura é importante na condução saltatória rápida do impulso nervoso e no suporte ao axônio subjacente. O citoplasma dessas células é completamente extrudido da mielina, exceto em áreas onde se formam canais que permitem a comunicação desta com o corpo celular dos oligodendrócitos (BRAHIC; ROUSSARIE 2009; EDGAR; GARBERN 2004; ROUSSARIE et al., 2007b; SALZER, 2003).

Cada oligodendrócito pode formar vários segmentos internodais de mielina sobre o mesmo ou sobre diferentes axônios, ou um mesmo axônio pode possuir segmentos adjacentes de oligodendrócitos diferentes (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; BRAHIC; ROUSSARIE 2009; BRODAL, 2010; SNELL, 2003). Essas células também circundam os corpos celulares neuronais e provavelmente tem função semelhante a das células satélites ou capsulares dos gânglios sensoriais periféricos. Acredita-se que eles influenciam no ambiente bioquímico dos neurônios (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; BRODAL, 2010; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011; SNELL, 2003).

A perda da bainha de mielina, mesmo de um único segmento internodal, é suficiente para bloquear a condução de impulsos nervosos entre neurônios. Se muitos axônios são afetados dessa maneira, os sintomas no SNC podem ser graves (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; DUGANDZIJA-NOVAKOVIC et al, 1995), como ocorre na doença de Alzheimer (MITEW et al., 2010; WOOD, 2006), na esquizofrenia (LUCAS et al., 2006), na esclerose múltipla (COLES et al., 1999; FILIPPI et al., 2000, 2004; FRISCHER et al., 2009; WOOD, 2006) e na doença desmielinizante causada pelo VEMT (BAUMANN; PHAM-DINH 2001; LIPTON, 1975; LUCAS et al., 2006; RODRIGUEZ, M. et al., 1987).

Astrócitos representam cerca de 40% das células presentes no encéfalo. São geralmente divididos em dois grupos distintos, baseados na morfologia e na localização no SNC: astrócitos protoplasmáticos, encontrados principalmente na substância cinzenta e compostos de um corpo celular grande com cromatina condensada e prolongamentos curtos, finos e ramificados; e astrócitos fibrosos, encontrados na substância branca e caracterizados pela presença de núcleo com cromatina mais dispersa e corpo celular menor, do qual partem prolongamentos longos, delgados, lisos e pouco ramificados (DALLAS et al., 2006; MARIN-PADILLA, 1995; OBERHEIM et al., 2012; VERKHRATSKY et al., 2010). Além dessas duas classes, astrócitos especializados situados em diferentes áreas do cérebro foram definidos a partir do século XX, incluindo a glia de Bergmann do cerebelo, a glia de Miller da

retina, glia radial e tanicitos (KETTENMANN; VERKHRATSKY 2008; KIMELBERG; NEDERGAARD 2010; OBERHEIM et al., 2012).

Os Astrócitos funcionam como um substrato, capacitando neurônios a migrarem de seus pontos de origem para o seu destino final durante a formação neurológica por meio da expressão de moléculas de superfície (BENARROCH, 2005; RAKIC et al., 1996). Além disso, participam juntamente com as células endoteliais na formação da barreira hematoencefálica, promovendo o suporte estrutural dessas células e evitando que substâncias hidrossolúveis potencialmente prejudiciais atravessem e cheguem ao encéfalo (BENARROCH, 2005; BONKOWSKI et al., 2011; BRODAL, 2010; DALLAS et al., 2006; KIMELBERG; NORENBORG 1989; ZHANG, Y. et al., 2010). O contato íntimo com neurônios, capilares e líquido cefalorraquidiano permite que os astrócitos controlem o ambiente das células neuronais – o fluido extracelular do cérebro – mantendo a fisiologia normal do SNC (ALLAMAN et al., 2011; BENARROCH, 2005; BRODAL, 2010; RAKIC et al., 1996, ZHANG, Y. et al., 2010). Esse controle é importante pelas seguintes razões: os neurônios são muito sensíveis a mudanças nas concentrações extracelulares de íons e neurotransmissores; e a pressão osmótica deve ser firmemente controlada devido o cérebro não poder se expandir no crânio (BRODAL, 2010).

Além disso, os astrócitos podem liberar fatores de crescimento (FG) para neurônios, modulando a sobrevivência e diferenciação dos mesmos (BENARROCH, 2005; GOMES et al., 1999; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011), e podem se tornar reativos durante uma injúria ou infecção no SNC, o que leva à produção de fatores solúveis – proteases, citocinas e enzimas metabólicas – que participam da resposta imune e inflamatória (ALOISI et al., 2001; DALLAS et al., 2006; LI et al., 2012; WIESE et al., 2012).

Em vista dessas importantes funções atribuídas aos astrócitos, qualquer distúrbio nessas células desempenha um papel importante em certas doenças do SNC. Lesões no cérebro geralmente resultam no aumento do tamanho e do número de astrócitos – processo chamado gliose reativa – e na produção de citocinas pro-inflamatórias, alterando a morfologia e aumentando a atividade metabólica dos mesmos. O resultado dessa reação é, geralmente, a formação da chamada “cicatriz glial”, que isola a área danificada agindo como uma barreira para reinervação (FAULKNER et al., 2004; LUCAS et al., 2006; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011; TARDY, 2002).

Os ependimócitos são células gliais cilíndricas, que revestem as cavidades do encéfalo e o canal central da medula espinhal, formando uma camada única de células que limitam o espaço ventricular do encéfalo dos vertebrados. Essas células ciliadas participam da

circulação do líquido cefalorraquidiano e a presença de microvilosidades em suas superfícies livres parece indicar uma função absorptiva. Embora a superfície luminal das células endoteliais seja plana, na face profunda as células formam prolongamentos que se misturam ao tecido nervoso subjacente (SNELL, 2003; ZHANG et al., 2007). Uma subpopulação destas células presente no encéfalo de indivíduos adultos pode estar associada com a possível função precursora neural do sistema nervoso (MOMMA et al., 2000).

As micróglia foram primeiramente descritas pelo neuroanatomista espanhol Pio del Rio-Hortega, em 1932. O termo micróglia refere-se às células de tamanho pequeno, igualmente distribuídas no SNC, que ocupam o parênquima do SNC e apresentam a maioria das propriedades dos macrófagos residentes em outros tecidos, sendo distinguidas de outros tipos de macrófagos do cérebro pela sua localização parenquimal e sua função (BRODAL, 2010; ROCK et al., 2004). Constituem cerca de 10% das células presentes no SNC e representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores e outros tipos de injúria no tecido cerebral (BRODAL, 2010; CARPENTIER et al., 2007; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012).

A micróglia existe no SNC em várias formas morfológicamente distintas, incluindo os tipos ramificado (em repouso), reativo (ativada) e ameboide (fagocítico). Sob condições fisiológicas, essa célula se encontra em estado de repouso, atuando como um sensor do microambiente cerebral. Seus prolongamentos estão constantemente procurando e eliminando substâncias estranhas e células doentes ou mortas. Após uma infecção ou injúria, torna-se ativada, resultando na retração de seus prolongamentos, na proliferação e regulação de vários fatores de superfície celular (BRODAL, 2010; DALLAS et al., 2006; LEE et al., 2001; SAIJO et al., 2013; STREIT et al., 1999).

Além disso, as células microgliais são equipadas com receptores para neurotransmissores, sugerindo que podem ser sensíveis ao estado de atividade neuronal das redondezas (BRODAL, 2010; DALLAS et al., 2006; LEE et al., 2001). O início da ativação microglial ainda não foi estabelecido, embora determinadas citocinas estejam envolvidas, promovendo ativação ou inibição dessas células (NAKAMURA, 2002). Alguns receptores de reconhecimento de padrão (RRP) localizados na superfície das células microgliais, tais como os da família dos receptores semelhantes ao Toll (TLR [Toll like receptors]), desempenham um papel importante na ativação de micróglia e desenvolvimento da resposta inflamatória (FURR; MARRIOT 2012; SAIJO et al., 2013).

De modo geral, as micróglia respondem a lesões neuronais com mudanças morfológicas e funcionais, que são conhecidas como ativação glial (JORGENSEN et al.,

1993; LUCAS et al., 2006). Em situações patológicas, como doenças neurodegenerativas, injúria traumática e invasão tumoral, essas células são ativadas, migram para o local da lesão, cercam o tecido danificado ou as células mortas e limpam os resíduos celulares da área (LUCAS et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012).

A reação glial *in vivo* produz uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos, os quais estão envolvidos tanto na neuroproteção quanto na neurodegeneração (SAIJO et al., 2013; SOLA et al., 2002). Nesse último caso, a micróglia reativa pode ser considerada um mediador de morte de neurônios nas lesões isquêmicas. Um mecanismo comumente observado em várias doenças é a produção em excesso de neurotoxinas pela micróglia, incluindo NO, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e espécies reativas de oxigênio (ROS [Reactive oxygen species]). A produção excessiva desses fatores leva à ativação de astrócitos, de outras micróglia e, por fim, à morte de neurônios (LEE et al., 2001; MACK et al., 2003; KLEGERIS et al., 2007; SAIJO et al., 2013). Devido à complexidade do estudo da ativação glial *in vivo*, esse fenômeno é frequentemente caracterizado usando modelos *in vitro* (SOLA et al., 2002).

1.3 PATOGENIA DA INFECÇÃO VIRAL

1.3.1 Neuroinvasão

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

Quando o vírus da estomatite vesicular indiana (VEVI) é inoculado por via intranasal (i. n.) em camundongos BALB/c com 5 a 7 semanas de idade, os receptores olfativos são as primeiras células a serem infectadas (PLAKHOV et al., 1995, REISS et al., 1998), seguidas por neurônios do bulbo olfatório, e finalmente, a infecção aguda se dissemina para neurônios de outras áreas do cérebro. Essa infecção está associada com encefalite aguda, quebra da barreira hematoencefálica e alto grau de mortalidade, similar ao que é visto em infecções pelo vírus da raiva (FORGER et al., 1991; HUNEYCUTT et al., 1994).

A inoculação por via i. n. em camundongos BALB/c nocautes, desprovidos de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺, mostraram que embora essas células limitassem a replicação e

a disseminação viral, elas contribuíam pouco para o desenvolvimento das alterações histopatológicas observadas (lesão tecidual), sugerindo que as células residentes do SNC devem ter um papel importante na iniciação e/ou progressão da inflamação do SNC (HUNEYCUTT et al., 1994; NANSEN et al., 2000).

Por outro lado, a infecção por picornavírus induz mudanças características em células infectadas: o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são os primeiros a serem destruídos; ocorre marginalização da cromatina, caracterizada pela perda da textura microscópica homogênea do material nuclear que se acumula dentro do núcleo; mudanças na permeabilidade da membrana; e no citoplasma, aparecem vesículas que se iniciam às proximidades do envelope nuclear e se espalham pelo citoplasma até estar inteiramente preenchido (RACANIELLO, 2007; RUECKERT, 1996).

O VEMT, um picornavírus de camundongos do gênero *Cardiovirus*, assim como outros membros da família *Picornaviridae*, é transmitido por via oral/fecal. O VEMT infecta primeiramente neurônios do hipocampo, córtex e estriato do SNC e medula espinhal e se espalha para outras células por meio do transporte axonal em aproximadamente duas semanas, persistindo em oligodendrócitos, nos canais citoplasmáticos da mielina e macrófagos (BRAHIC, 2002; BRAHIC et al., 2005; BRAHIC; ROUSSARIE 2009; DRESCHERS et al., 1999; NJENGA et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 2003; ROUSSARIE et al., 2007a, 2007b).

O VEMT provoca uma doença crônica desmielinizante no SNC de camundongos inoculados por via i. c. (BRIGHT et al., 1999; MILLER et al., 1997; ROUSSARIE et al., 2007a). Estudos demonstraram que, uma semana depois da inoculação i.c. do VEMT, os camundongos desenvolvem polioencefalite aguda caracterizada pelo envolvimento da substância cinzenta e clinicamente pela presença de paralisia flácida (BRAHIC; ROUSSARIE 2009; KREUTZER, 2012; LIPTON, 1975; POZNER et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 1987).

1.3.2 Aspectos clínicos e morfológicos

O SNC foi considerado por muito tempo como um local imuno-privilegiado – uma região do corpo que não gera uma resposta inflamatória normal contra um antígeno estranho (BAILEY et al., 2007; STEINMAN, 2008). Hoje está claro que reações inflamatórias podem ocorrer no SNC, como nas doenças desmielinizantes, neurodegenerativas ou causadas por microrganismos (BAILEY et al., 2007; BENVENISTE, 1997; FAZAKERLEY, 2004).

A neurodegeneração é um processo crônico que resulta na perda progressiva de função, estrutura e quantidade de células neuronais, levando a uma atrofia generalizada do

cérebro e déficit cognitivo profundo. O processo neurodegenerativo afeta a conectividade das redes neurais, que é crítica para o processamento das informações e poder cognitivo, e reduz o potencial neuroprotetor das células gliais (KNIGH; VERKHRATSKY 2010; LANSBURY; LASHUEL 2006; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011; TERRY; BUCCAFUSCO 2003).

Durante muitos anos, doenças neurodegenerativas foram consideradas como patologias específicas de neurônios. Nos últimos anos, no entanto, as evidências demonstram que o potencial patológico das neuroglias tem desafiado o ponto de vista neurocêntrico (HENEKA et al., 2010; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011; ROSSI; VOLTERRA 2009). As alterações em astrócitos nas doenças neurodegenerativas são bastante complexas. Acreditava-se que a neurodegeneração era disparada pela astrogliose reativa; porém, estudos recentes em vários modelos animais desses tipos de doença revelaram que o início do processo neurodegenerativo é devido à lesão de astrócitos, que pode afetar a transmissão sináptica e provavelmente estar envolvida com os primeiros déficits cognitivos. Em estágios mais avançados, a neurodegeneração promove também a ativação de células microgliais, o que contribui para o estabelecimento do processo neuroinflamatório com produção de citocinas em doenças neurodegenerativas (HENEKA et al., 2010; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011).

Muitas investigações evidenciaram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias expressas por células gliais de pacientes com doença de Parkinson – doença neurodegenerativa na qual os neurônios dopaminérgicos da substância negra são seletivamente degenerados –, promovendo efeitos deletérios no SNC dos mesmos. (CIESIELSKA et al., 2003; RODRÍGUEZ; VERKHRATSKY 2011).

A fase crônica da infecção causada pelo VEMT é caracterizada por uma doença desmielinizante inflamatória com as seguintes características clínicas: fraqueza nos membros inferiores, balanço da marcha e paralisia espástica. Camundongos na fase crônica da doença apresentam alterações degenerativas neuronais graves, proliferação microglial principalmente no tronco cerebral e no tálamo, inflamação perivascular da substância branca da medula espinhal e leptomeninges e desmielinização crônica progressiva (KREUTZER, 2012; LIPTON, 1975; RODRIGUEZ et al., 1987). Dependendo da cepa, pode ocorrer pouca ou nenhuma remielinização realizada por oligodendrócitos ou pelas células de Schwann (DAL CANTO et al., 2005; KREUTZER, 2012; ULRICH et al., 2008). Foi observada também uma resposta autoimune contra antígenos da bainha de mielina – principal causa da desmielinização – o que contribui para a progressão da lesão em camundongos susceptíveis. Por isso, a doença desmielinizante induzida pela persistência do VEMT principalmente em

oligodendrócitos é usada como modelo animal de esclerose múltipla (EM) (GRIGORIADIS; HADJIGEORGIOU 2006).

Segundo Araújo (2006), estudos anatomo-patológicos em camundongos infectados pelo vírus Juruacá, objeto deste trabalho, demonstraram alterações progressivas, principalmente no SNC, tais como reatividade glial com tendência à formação de nódulos gliais, espongiose, vasos mostrando endotélio hipertrofiado com frequente marginação leucocitária e congestão, presença de células neuronais com aspecto apoptótico (condensação citoplasmática, picnose nuclear de células isoladas) e infiltrado de células inflamatórias com polimorfonucleares (neutrófilos). Além disso, cultivos primários de células do SNC – astrócito, micróglia e neurônio – não apresentaram efeito citopático (ECP) quando inoculados com esse vírus; porém, foi observada a presença de antígenos virais em culturas de astrócitos e micróglia infectadas. A ocorrência desta, assim como a ausência de ECP em cultivos primários de células do SNC, sugerem que a infecção pelo vírus Juruacá em camundongos recém nascidos tenha resultado na exacerbação da resposta imune.

1.3.3 Resposta imune à infecção viral

A interação entre o sistema imune e o SNC constitui a atividade mais complexa e interativa em mamíferos (BECHER et al., 2000; BERGMANN et al., 2006). O SNC regula o sistema imune pela resposta hormonal e pelo sistema nervoso autônomo; enquanto que o sistema imune pode regular o SNC pela produção de citocinas, as quais exercem efeitos autócrinos e parácrinos que influenciam na secreção de hormônios e proliferação celular. Uma ruptura na comunicação e propriedade regenerativa do SNC torna o indivíduo vulnerável a doenças infecciosas, bem como a injúrias físicas (BERGMANN et al., 2006; ESKANDARI et al., 2003).

Os organismos vivos desenvolveram diversos tipos de defesas contra a invasão de microrganismos patogênicos, inclusive para agentes virais. A ativação do sistema imune no SNC é uma característica clássica em lesões isquêmicas, doenças neurodegenerativas, distúrbios mediados por imunidade, infecções e traumas, que resultam em lesão neuronal. Em casos de doenças causadas por agentes virais, essa ativação é crucial para estabelecer um estado antiviral no SNC que é capaz de limitar a replicação e disseminação dos vírus e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas necessárias para atrair e ativar as células do sistema imune ao local da infecção (ABBAS et al., 2012; AMOR et al., 2010; NEUMANN et al., 2009; SCHWARTZ et al., 2009; SOUCY-FAULKNER et al., 2010).

Em um nível mais básico, o sistema imune pode ser visto em dois ramos interconectados. A resposta imune inata é o ramo mais antigo, sendo descrito nos ancestrais mais primitivos. Ela evoluiu juntamente com os microrganismos de modo a proteger de infecções todos os seres multicelulares. As células da imunidade inata usam diversos receptores para detectar e sinalizar a ocorrência de uma invasão microbiana, tendo essa sinalização duas funções principais: iniciar uma cascata inflamatória que ajuda a conter o processo infeccioso e ativar a resposta imune adaptativa, o segundo ramo do sistema imune (ABBAS et al., 2012; BARTON, 2008; GUIDOTTI et al., 2001; ZAISS et al., 2002).

A imunidade inata desempenha três funções importantes: é a primeira resposta aos microrganismos que previne, controla e elimina a infecção do hospedeiro causada por diversos agentes patogênicos ou injúrias no tecido; seus mecanismos reconhecem os produtos de células danificadas e mortas do hospedeiro, eliminando-os e iniciando o processo de reparo tecidual; e sua ativação estimula o desenvolvimento da resposta imune adaptativa e pode influenciar a natureza dessa resposta, tornando-a mais eficaz contra diferentes tipos de agentes patogênicos (ABBAS et al., 2012).

O mecanismo que ativa o sistema imune inato é o reconhecimento de microrganismos invasores por receptores denominados de RRP e podem ser encontrados na membrana ou em forma de proteínas solúveis. Esses receptores reconhecem estruturas moleculares denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são características de patógenos microbianos, mas não estão presentes em células de mamíferos, e incluem RNAs de fita dupla, sequências CpG não metiladas de DNA, proteínas, lipídeos, carboidratos complexos, dentre outros (ABBAS et al., 2012; BARTON, 2008; CARPENTIER et al., 2007; GUIDOTTI et al., 2001; KAWAI; AKIRA 2006; KUMAR et al., 2006, 2009; SOUCY-FAULKNER et al., 2010; WAKEFIELD et al., 2010; ZAISS et al., 2002).

A maioria dos tipos celulares expressa os RRP e, por isso, é capaz de participar de respostas imunes inatas, reconhecendo os componentes essenciais a sobrevivência dos patógenos e produzindo citocinas inflamatórias. Células fagocíticas, incluindo neutrófilos e macrófagos, e células dendríticas expressam as maiores variedades e quantidades desses receptores, o que contribui para a realização das funções de detecção dos microrganismos, ingestão e eliminação dos mesmos e indução do processo inflamatório, com consequente ativação da resposta imune adaptativa (ABBAS et al., 2012; WAKEFIELD et al., 2010).

Em infecções virais, vários tipos de TLR – um dos RRP mais estudados –, tais como TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, expressos na membrana de endossomos de células dendríticas plasmocitóides (pDCs), participam do reconhecimento de componentes virais, como DNA e

RNA genômicos, por meio de mecanismos independentes de replicação. Além disso, algumas células expressam helicases de RNA que funcionam como RRP para os componentes virais, sendo também essenciais no estabelecimento da imunidade antiviral juntamente com os IFNs do tipo I (ANUKUMAR; SHAHIR 2012; HEIL et al., 2004; KAWAI; AKIRA 2006; KUMAR et al., 2006; LUND et al., 2006).

Os principais mecanismos da resposta imune inata contra agentes virais são a inibição do processo infeccioso por interferons do tipo I – IFN- α e IFN- β –, pois tem efeito direto sobre agentes virais e células vizinhas não infectadas, enquanto ativa a resposta imune adaptativa contra vírus. Estão associados à regulação dos mecanismos de apoptose e morte de células infectadas mediada por células natural killer (NK), um mecanismo importante no início da infecção, antes do desenvolvimento da imunidade adaptativa. A rápida indução desses mecanismos de apoptose em células hospedeiras infectadas com vírus é um componente crítico da resposta imune inata antiviral (ABBAS et al., 2012; EVERETT; MAC FADDEN 1999; KAWAI; AKIRA 2006; PARRONCHI et al., 1992; WARK et al., 2005).

A resposta imune adaptativa, por sua vez, é reconhecida apenas em vertebrados e consiste, basicamente, na proliferação de linfócitos específicos para o agente patogênico, um processo altamente efetivo e específico, mas que leva dias para se desenvolver por completo. A imunidade adaptativa contribui para exacerbar o efeito da resposta imune inata. Muitos microrganismos patogênicos evoluíram tornando-se resistentes à imunidade inata, e a proteção contra essas infecções passa a depender fundamentalmente da resposta imune adaptativa (ABBAS et al., 2012; BARTON, 2008).

A imunidade adaptativa contra infecções virais é mediada por anticorpos que bloqueiam a ligação do vírus e a sua entrada nas células hospedeiras, podendo também provocar a destruição das células infectadas para eliminar o agente viral (ABBAS et al., 2012; SANTOS et al., 2009). Os anticorpos antivirais ligam-se ao envoltório ou aos antígenos do capsídeo do vírus e desempenham funções principalmente neutralizantes, prevenindo tanto a infecção inicial como a disseminação do vírus entre as células. Além disso, os anticorpos podem opsonizar partículas virais e ativar o sistema complemento, promovendo a eliminação do patógeno por meio de fagocitose (ABBAS et al., 2012; KAWAI; AKIRA 2006).

A eliminação dos agentes virais do interior das células hospedeiras é mediada por linfócitos T citotóxicos (LTC) que destroem células infectadas. A maioria dos LTC específicos para vírus são chamados de células T CD8⁺, que sofrem processos de proliferação e diferenciação maciços mediante a presença de citocinas liberadas pelas células T CD4⁺. São capazes de reconhecer peptídeos virais citosólicos específicos apresentados pelas moléculas

do MHC de classe I, destruindo qualquer célula infectada, ativando nucleases que degradam o genoma viral e secretando citocinas, como IFN- γ , para o controle da infecção (ABBAS et al., 2012; JACOBSON 2002; KAWAI; AKIRA 2006; MURRAY et al., 2006; SANTOS et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram que doenças causadas pelo vírus da coriomeningite linfocítica (VCML) (FISCHER et al., 2006; BARTON et al., 2002) e pelo vírus da hepatite B infectam células específicas sem provocar lesão direta. Nesses casos, a destruição das células infectadas é provocada pela ativação dos LTC específicos a esses vírus, na tentativa de erradicar a infecção (ABBAS et al., 2012).

1.3.4 Resposta imune no SNC

As células do SNC podem iniciar, regular e sustentar uma resposta imune (BECHER et al., 2000; CARPENTIER et al., 2007). A vigilância imune limitada do SNC faz com que seja crucial a capacidade das células residentes em reconhecer rapidamente e responder à infecção sem causar danos extensivos ao cérebro. A imunidade inata depende primeiramente das funções das células gliais, tais como astrócitos e micróglia, que são importantes para o rápido controle da replicação do patógeno e para direcionar o recrutamento e a ativação de células do sistema imune adaptativo necessárias para a eliminação do agente patogênico (BAILEY et al., 2007; CARPENTIER et al., 2007; HOWE et al., 2012; SAVARIN et al., 2010; SAVARIN; BERGMANN 2008; SILVA, M., 2010).

Astrócitos e micróglia contribuem para a formação da resposta imune inata no SNC por meio do reconhecimento dos PAMPs por diferentes tipos de RRP. Dentre as funções imunes inatas dessas células gliais estão incluídas as propriedades anti-microbianas com produção de IFN do tipo I e indução da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que é responsável pela produção de NO. Astrócitos e micróglia também produzem uma série de quimiocinas, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, e citocinas pró e anti-inflamatórias que possibilitam o desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa (BAILEY et al., 2007; CARPENTIER et al., 2007; HOWE et al., 2012; OLSON; MILLER 2004).

Durante uma infecção viral, a simples interação entre as proteínas de superfície viral com proteínas da superfície celular deflagra reações celulares que, em muitos casos, conduz a uma primeira onda de produção de citocinas. Além disso, muitas proteínas virais que não estão presentes na partícula infecciosa, o acúmulo de RNA viral e a sobrecarga da maquinaria

de produção de proteínas também induzem sinais que disparam uma resposta inicial do hospedeiro à infecção com síntese de citocinas (MOGENSEN; PALUDAN 2001).

1.3.5 Citocinas

O termo citocina inclui uma grande e diversa família de moléculas de sinalização – peptídeos ou glicoproteínas, geralmente – que tem como atividade principal a modulação da resposta imune (BAUER et al., 2007; HERBERT et al., 2012; JANSSEN et al., 2010; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012). São produzidas por várias células imunes e não imunes de diferentes origens embrionárias e seus efeitos biológicos incluem estimulação ou inibição da proliferação celular, citotoxicidade/apoptose, atividade antiviral, crescimento e diferenciação celular, resposta inflamatória e regulação da expressão de proteínas de membrana (ABBAS et al., 2012; BAUER et al., 2007; KOZIEL, 1999; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012).

As citocinas participam da patogênese de diversas doenças, incluindo infecciosas, auto-imunes, acidente vascular encefálico (AVE), traumas, transtornos neuropsiquiátricos e doenças neurodegenerativas. Elas se ligam a receptores específicos para iniciar a transdução de sinal e a formação do complexo citocina-receptor desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na ativação da transcrição e modulação da atividade celular (ABBAS et al., 2012; JANSSEN et al., 2010; KOZIEL, 1999). Algumas delas estão claramente associadas com a indução do processo inflamatório, sendo então chamadas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFNs, IL-23; enquanto que outras têm a função de suprimir a atividade das citocinas pró-inflamatórias e são denominadas de anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e TGF- β (ABBAS et al., 2012; BROWN; HURAL 1997; CHAKRABARTY et al., 2012).

A IL-12 possui importante papel na regulação da resposta imune inata inicial a microrganismos intracelulares como bactérias, protozoários e vírus (COUTERLIER et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2008). A IL-12 é essencial em resposta à infecção viral por ser um potente indutor de IFN- γ em células NK e linfócitos T e acentuar a função citolítica de LTC CD8⁺ e de células NK, além de estimular a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ em células T_h1 (ABBAS et al., 2012; COUTERLIER et al., 1995; DEL VECCHIO et al., 2007; NGUYEN et al., 2012; ORANGE et al., 1996; PAGENSTECHER et al., 2000). Esta citocina é produzida por macrófagos ativados e células

dendríticas e é negativamente regulada pela IL-4 e IL-10, potentes citocinas indutoras da resposta do tipo T_H2 (BUXBAUM; SCOTT 2005; TRIPATHI et al., 2007).

A família da IL-1 inclui as proteínas IL-1 α e IL-1 β e é um importante iniciador da resposta imune, desempenhando um papel fundamental no aparecimento e desenvolvimento da cascata inflamatória celular (ABBAS et al., 2012; LUCAS et al., 2006; MASON et al., 2001; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012). É um potente indutor endógeno e exógeno de febre por interferir na termorregulação hipotalâmica, e está envolvido com os estímulos para manutenção do sono e memória (LUCAS et al., 2006; POLLMACHER et al., 2002).

As principais fontes de IL-1 β , assim como de TNF- α , são os fagócitos mononucleares ativadas, sendo também produzidas por neutrófilos, células epiteliais e endoteliais (ABBAS et al., 2012; SIMS; SMITH 2010). Essa citocina está presente poucas horas após injúria no tecido cerebral de humanos e roedores e parece estar associada à neurodegeneração em doenças desmielinizantes, como na esclerose múltipla (LUCAS et al., 2006; MASON et al., 2001; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012), e em infecções virais (MASON et al., 2001; SIMS; SMITH 2010). Além disso, promove a ativação de astrócitos estimulando a produção de IL-6, do fator estimulador de colônia de macrófagos (MCSF) e a atividade da iNOS; além disso, induz a ativação de micróglia (LUCAS et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012). Essa citocina, juntamente com o TNF- α , são importantes para mediar a infiltração de leucócitos no tecido lesionado (MOYNAGH, 2005; SIMS; SMITH 2010).

A IL-6 é uma citocina de grande importância nas respostas inflamatórias agudas apresentando efeitos locais e sistêmicos, como a síntese de mediadores inflamatórios hepáticos, a estimulação da proliferação de neutrófilos na medula óssea – servindo também como um fator quimiotático para essas células – e a diferenciação de células T helper produtoras de IL-17 (CHEN et al., 2007; HAYNES et al., 2001; KHAYRULLINA et al., 2008; LEVITZ et al., 2012). É considerada como um pirógeno endógeno que exerce efeitos benéficos ou destrutivos para as células do SNC. Sua expressão no cérebro é baixa em condições fisiológicas, porém é bastante elevada em um grande número de doenças neurológicas humanas (ABBAS et al., 2012; LUCAS et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012).

A produção da IL-6 pode ser estimulada em fagócitos mononucleares, células vasculares endoteliais e fibroblastos por uma variedade de moléculas, incluindo IL-1 β , TNF- α , TGF- β , e prostaglandinas (PG), tendo sua produção inicial potencializada por mediadores inflamatórios, como IFN- γ , IL-4 e mediador β -amilóide. Da mesma maneira que a IL-1 β , a

IL-6 tem efeitos diretos e indiretos sobre as células neuronais, além de promover a astrogliose, ativar as células microgliais e estimular a produção de proteínas de fase aguda (ABBAS et al., 2012; LUCAS et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica com atividade biológica importante nos processos inflamatórios, pois é responsável pelo início e regulação da cascata de sinalização durante a resposta inflamatória (ABBAS et al., 2012; HAVELL, 1987; LUCAS et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012). Quando produzida em pequenas quantidades, atua como regulador parácrino e autócrino de leucócitos e células endoteliais; porém, em quantidades maiores, atua de forma endócrina, provocando efeitos letais (LUCAS et al., 2006; WOOD, 2006).

No estado inflamatório ou em situação de doença, o TNF- α , juntamente com outros mediadores pró-inflamatórios e substâncias neurotóxicas, é sintetizado principalmente por macrófagos, células dendríticas e células neurogliais em resposta a estímulos patológicos, estimulando a produção de outras citocinas, como IL-1 β e IL-6, promovendo a gliose (ABBAS et al., 2012; LUCAS et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012).

O IFN- γ é uma citocina sintetizada por linfócitos T, células apresentadoras de antígenos e células NK. Sua liberação por esses dois últimos tipos celulares é considerada um evento vital para o início da resposta imune inata (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; RODRIGUEZ et al., 2003). Essa citocina medeia vários efeitos imunomoduladores em células do SNC tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa, incluindo ativação de macrófagos, promoção da adesão leucocitária seguida do tráfico de células para o SNC, efeitos antiproliferativos, antivirais e indução da síntese de outras citocinas, como TNF- α e IL-1. A expressão do IFN- γ foi tradicionalmente atribuída a infiltrados de células NK e células T CD4⁺ (CHESLER; REISS 2002; GEIGER et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 2003).

Além disso, o IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce papel importante na imunidade mediada por células contra microrganismos intracelulares, induzindo a produção de IL-12. Também estimula a expressão de moléculas de MHC de classe II em macrófagos e micróglia, promove a diferenciação de células T CD4⁺ para a subpopulação T_h1, inibe a diferenciação de células T *náive* nos subtipos T_h2 e T_h17 e atua na troca do isotipo de anticorpos para atuarem como opsonizantes e fixadores do complemento (ABBAS et al., 2012; GEIGER et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 2003; SAMUEL; DIAMOND 2005; XIE et al., 2000).

A IL-4 é produzida por células T_h2 e células da linhagem de mastócito e basófilos. É uma citocina pleiotrópica que desempenha um papel importante na resposta T_h2, medeia o

recrutamento de mastócitos e estimula a produção de anticorpos IgE por meio da diferenciação de células B em células secretoras desse tipo de anticorpo (ABBAS et al., 2012; AWASTHI et al., 2004; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012; VILELA et al., 2010), além de ser 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 encefalomielite alérgica experimental (EAE) (KUCHROO et al., 1995; PONOMAREV et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Também tem efeitos inibidores na expressão de citocinas pró-inflamatórias, sendo capaz de bloquear e suprimir as citocinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8. A IL-4 pode ainda exercer seu efeito neuroprotetor por meio da inibição de IFN- γ e da redução da concentração de TNF- α , de NO e ROS (ABBAS et al., 2012; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012; SILVA et al., 2008).

A IL-10 foi primeiramente descrita como um fator associado à resposta T_h2 que envolvia a regulação dos sinais pró-inflamatórios da resposta T_h1. No entanto, sabe-se hoje que é uma das principais citocinas anti-inflamatórias produzida por diferentes tipos celulares, tais como macrófagos, células dendríticas, células B e vários subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺, desempenhando um papel importante na homeostase neural e sobrevivência celular. A IL-10 tem um papel regulador central realizando a limitação imunopatológica em respostas imunes muito intensas, como em doenças autoimunes (COUPER et al., 2008; MCKINSTRY et al., 2009; O’GARRA; VIEIRA 2007; RONCAROLO et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012; SILVA et al., 2008).

Essa citocina limita a inflamação por reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , suprimindo a expressão de receptores de outras citocinas e inibindo a ativação de receptores no encéfalo. A IL-10 também inibe a produção de IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófago (GM-CSF) (COOLS et al., 2007; MOORE et al., 2001; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012; SCHANDENE et al., 1994), a síntese de IFN- γ em linfócitos T auxiliares e a atividade das células dendríticas, realizando dessa forma o controle da imunidade inata e adaptativa contra microrganismos intracelulares (COOLS et al., 2007; KOSSODO et al., 1997).

O TGF- β é sintetizado como um precursor inativo por células T regulatórias inicialmente estimuladas por antígenos, fagócitos mononucleares ativadas por LPS, células B e células NK (COOLS et al., 2007; KEHRL et al., 1986; RONCAROLO et al., 2006; WAHL, 1994).

Essa citocina é um regulador importante da proliferação, da diferenciação celular e formação da matriz extracelular. O TGF- β também pode converter um sítio inflamatório em um local de reparação celular, inibir a proliferação e diferenciação de células T e B, impedir a ativação de macrófagos e limitar a produção das citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α , provocando diminuição da resposta oxidativa e da produção de NO e promovendo o aumento da morte celular por apoptose (RONCAROLO et al., 2006; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012; WAHL, 2004). Além disso, é um potente fator quimiotático, recrutando monócitos, neutrófilos e linfócitos para o local da inflamação; influenciando também na adesão e ativação de leucócitos (WAHL, 2004).

A IL-2 é uma das principais citocinas produzidas por células T CD4⁺ após a sua ativação. É designado como um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação para linfócitos T, agindo nas mesmas células que a produzem ou em células adjacentes. Sua produção é rápida e transitória, começando dentro de duas a três horas da ativação das células T. Essa citocina é necessária para a sobrevivência e funcionamento das células T regulatórias, que suprimem as respostas autoimunes e respostas contra antígenos estranhos. Também foi demonstrado que a IL-2 estimula a proliferação e diferenciação das células B e NK *in vitro* (ABBAS et al., 2012; SADLACK et al., 1993; SEDDIKI et al., 2006).

A IL-17 é produzida por células T_h17 e tem um papel essencial tanto em inflamações agudas quanto crônicas. Atua como um mediador de recrutamento de neutrófilos e macrófagos no local da infecção por meio da produção de quimiocinas (KHADER; COOPER 2008; KHADER et al., 2007; KHAYRULLINA et al., 2008; PARK et al., 2005; SERGEJEVA et al., 2005; SILVA et al., 2008). As células T associadas à resposta imune inata também podem produzir IL-17, como as células $\gamma\delta$ T em infecção por micobactérias (KHADER; COOPER 2008; UMEMURA et al., 2007).

Vários relatos mostraram que muitas citocinas são produzidas por neurônios e células gliais e uma série de estudos indicaram alterações nos níveis de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IFN- α , e do receptor tipo B da IL-18 em pacientes com doença de Alzheimer (AMOR et al., 2010; CHAKRABARTY et al., 2012; RUBIO-PEREZ; MORILLAS-RUIZ 2012; WYSS-CORAY, 2006). Outras evidências sugerem que citocinas pró-inflamatórias desempenham papel importante na fisiopatologia de transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão. Pacientes depressivos apresentam aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias – IL-1, IL-6, TNF- α , dentre outras –, proteínas de fase aguda, quimiocinas e moléculas de adesão (JANSSEN et al.,

2010). Estudos com citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , mostraram inibição da neurogênese e morte de células no hipocampo (JANSSEN et al., 2010; KOO; DUMA 2008).

As citocinas desempenham um papel muito importante na patofisiologia de infecções virais. A expressão de citocinas no SNC tem sido observada na infecção por coronavírus neurotrópicos (LI et al., 2004), rabdovírus neurotrópicos (BI et al., 1995), citomegalovírus, vírus herpes simples, HIV 1 e pelo VEMT, um membro da família *Picornaviridae* (ROCK et al., 2004; ROUSSARIE et al., 2007a).

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) causada por infecções é uma condição típica em que mediadores pró-inflamatórios liberados de células infectadas pode resultar na falência de múltiplos órgãos. A explosão da síntese de citocinas em algumas infecções provocadas por agentes virais, como a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), causada por coronavírus, vírus influenza, vírus da dengue, vírus Epstein-Barr e enterovírus humano (EV71) induz estimulação de substâncias efetoras da resposta imune inata que alteram a fisiologia do organismo (CAMERON et al., 2008; WANG, S., 2008; WANG et al., 2012).

Estudos sugerem que as células T_h17 produtoras de IL-17 podem estar associadas à atividade protetora contra agentes virais, como em infecções causadas pelo vírus influenza (MCKINSTRY et al., 2009; PARISH; KAECH 2011), além de estarem envolvidas em processos inflamatórios crônicos e em doenças autoimunes, como ocorre na artrite reumatoide (COOKE, 2006; KHAYRULLINA et al., 2008; KRAMER; GAFFEN 2007; PARK et al., 2005).

Outros trabalhos demonstraram que micróglia infectadas com o HIV-1 secretam as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e as quimiocinas CXCL10 e CXCL2 que podem causar morte neuronal durante a atuação da resposta imune no SNC, desenvolvida para combater o agente patogênico (JONES; POWER 2006; VIVITHANAPORN et al., 2010). Outros vírus, como o VEMT, provocam a morte de neurônios não pela infecção celular direta, mas pelo desenvolvimento da resposta imune adaptativa (BUENZ et al., 2009; HOWE et al., 2012).

1.3.6 Óxido nítrico (NO)

O NO é um radical livre, gasoso, molecular, inorgânico, incolor. Na década de 1980, esse radical livre foi considerado apenas um poluente ambiental e um carcinógeno potencial;

hoje, o NO constitui-se em um mediador fundamental de processos intra e extracelulares (DUSSE et al., 2003; PEYROT; DUCROCQ 2008; SHEN; LIU 2006).

O NO participa do vasorrelaxamento dependente do endotélio, da citotoxicidade mediada por macrófagos, da inibição da ativação, adesão e agregação de plaquetas, da regulação da pressão sanguínea basal, do relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, da depressão sináptica a longo prazo, da potencialização dessa transmissão sináptica, da microcirculação medular e glomerular, e da prevenção de piloroespasmos em estenose pilórica hipertrófica infantil (CERQUEIRA; YOSHIDA 2002; DUSSE et al., 2003).

A produção de NO também pode ser 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 pela interação com TLR que desencadeiam a secreção de IL-12, IFN- γ e/ou TNF- α , necessárias para a liberação de NO (ANUKUMAR; SHAHIR 2012; BARNA et al., 1996; BOGDAN, 2001; REISS; KOMATSU 1998). O TGF- β por sua vez, é uma das citocinas responsáveis pela inibição da síntese de NO por meio da degradação da enzima iNOS em âmbito pós-traducional (BOGDAN, 2001; MACMICKING et al., 1997; PEYROT; DUCROCQ 2008).

Diversos tipos celulares, como neurônios, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas, células NK e células musculares lisas, são capazes de produzir NO por meio da conversão enzimática de L-arginina para L-citrulina mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (cNOS), dependentes de íons cálcio e de calmodulina, e pela iNOS, expressa por macrófagos e outras células ativadas (BOGDAN, 2001; CERQUEIRA; YOSHIDA 2002; CROEN, 1993; DUSSE et al., 2003; MOCHEL et al., 2010; DEL RÍO et al., 2006).

A iNOS não é normalmente expressa no cérebro, mas é induzida em astrócitos e micróglia por citocinas pró-inflamatórias e componentes patogênicos, como o LPS. Quando expressa em altas concentrações, induz a produção de grande quantidade de NO que, em determinadas condições, pode destruir neurônios por meio da inibição de mecanismos intracelulares necessários à sobrevivência dessa célula (BOGDAN, 2000, 2001; MANDER; BROWN 2005). As NOS ativadas, as proteínas imunorreativas de NOS e os mRNA são encontrados em doenças autoimunes, como esclerose múltipla associada com lesões desmielinizantes e artrite das articulações, sendo produzidas durante uma resposta imune (REISS; KOMATSU 1998).

Muitos estudos indicaram que o NO e seus derivados tem efeito inibidor em uma variedade de infecções virais (ANUKUMAR; SHAHIR 2012; FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2008) de animais, incluindo vírus herpes simples do tipo 1 (VHS1), vírus ectromelia, vírus

vaccinia (VV), vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus de leucemia murina (VLM), vírus da dengue. Essas moléculas atuam inibindo a replicação viral possivelmente por efeito direto sobre o vírus e sobre as células hospedeiras devido à sua citotoxicidade. Isso sugere que o NO pode ser um dos fatores vitais usados pela resposta imune inata para controlar os estágios iniciais de infecções virais no SNC. No entanto, se a produção dessa molécula não for devidamente regulada, pode causar sérios danos às células do hospedeiro (ANUKUMAR; SHAHIR 2012; BI et al., 1995; LEVY et al., 2010; NGUYEN et al., 1992).

1.3.7 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

ROS fazem parte de um grupo de radicais livres que são altamente instáveis e reativos. São os radicais livres mais importantes em sistemas biológicos devido ao envolvimento de oxigênio na maioria de suas reações químicas. ROS são de curta duração e tendem a reagir com outras biomoléculas para formar outros radicais livres de oxigênio, como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são os mais abundantes em organismos vivos (HARRISON, 2002; HUANG et al., 2011; MURPHY, 2009; SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR 2011). Embora sejam prejudiciais em concentrações elevadas, ROS, em condições fisiológicas, desempenham diversas funções benéficas na sobrevivência e imunidade como um importante mensageiro da sinalização celular (VALKO et al., 2007; HUANG et al., 2011).

ROS tem um papel fundamental na resistência do hospedeiro a patógenos. Sua produção durante a patogênese no tecido ou em resposta a infecções virais induz uma série de eventos adaptativos associados ao estresse oxidativo. ROS podem estar associadas a diversas condições patológicas, tais como doenças neurodegenerativas, distúrbios psiquiátricos, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, infecções, entre outras. Desempenham um papel importante na proliferação de células; morte celular por apoptose ou necrose; em alguns casos, estimulação de um ambiente pró-angiogênico; e formação de mutações no DNA mitocondrial e nuclear, com quebra na dupla fita que ativa o checkpoint celular, bloqueia a célula na fase G2 da divisão celular e induz a morte por apoptose (FANG, 2004; HRISTOV et al., 2010; HUANG et al., 2011; ROBERT et al., 2010; SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR 2007; SOUCY-FAULKNER et al., 2010; WANG, Y., 2008).

Diversos estudos demonstraram que as mitocôndrias produzem grandes quantidades de ROS como um subproduto do transporte de elétrons e, quando não regulado, podem resultar em danos no DNA mitocondrial e oxidação das membranas interna e externa dessas

organelas, permitindo a permeabilização. Mitocôndrias danificadas acumulam mais ROS, provocando aumento do estresse oxidativo celular e danos em outras organelas (HUANG et al., 2011; JIN, 2006; MURPHY, 2009; VALKO et al., 2007).

A produção de ROS é realizada pela ação da enzima NADPH oxidase fagocitária, que é dividida em Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, oxidase dupla 1 e 2 (Duox1 e 2). A Nox2 é a NADPH oxidase melhor caracterizada, sendo a mais expressa em fagócitos, desempenhando um papel importante na imunidade inata do hospedeiro. Quando induzida por estímulos variados, como a síntese de IFN- γ , promove a redução do oxigênio molecular em ROS. As subunidades dessa enzima encontram-se distribuídas na membrana e no citosol. Após estimulação, as subunidades se unem formando um complexo capaz de reduzir o O₂ em O⁻², que é convertido em H₂O₂ pela superóxido desmutase (ABBAS et al., 2012; HUANG et al., 2011; MOCHEL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2006; QIN et al., 2008; ROBINSON et al., 2004; SOUCY-FAULKNER et al., 2010).

Macrófagos e neutrófilos ativados são capazes de sintetizar ROS em grandes quantidades, promovendo a destruição de microrganismos e outras células; esse processo de síntese de ROS é denominado de explosão ou *burst* oxidativo (ABBAS et al., 2012; DUNAND, 2007; ROBINSON et al., 2004). Fatores virais desempenham um papel ativo na indução de ROS. Há precedentes da ativação de Nox2 em fagócitos durante a infecção causada pelo vírus da hepatite C e pelo vírus Epstein-Barr (GRUHNE et al., 2009; HRISTOV et al., 2010; LIN et al., 2011; MOCHEL et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos de vírus a partir de infecções experimentais em animais de laboratório e/ou cultivos celulares têm permitido a identificação da preferência 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.

A resposta imune inata, fase inicial da resposta imune a patógenos invasores, não depende das células de memória T e B, mas sim de fatores secretados por vários tipos celulares, principalmente macrófagos. No SNC, os macrófagos derivados de monócitos e micróglia cerebrais residentes apresentam receptores que interagem com componentes microbianos e disparam a resposta imune inata. Além dessas células, os astrócitos também participam da resposta inflamatória no SNC, contribuindo com a produção de citocinas, quimiocinas, NO e ROS.

A ocorrência de reatividade glial e lesões histopatológicas em tecidos de camundongos, mas a ausência de ECP em cultivos primários de células do SNC, conduziu a hipótese de que a infecção pelo vírus Juruaçá possa determinar uma exacerbação da resposta imune, que é letal em camundongos recém nascidos, levando ao óbito 100% dos animais inoculados após sete dias por inoculação intracerebral.

Este trabalho envolvendo a resposta das células residentes do SNC do hospedeiro contra o vírus Juruaçá contribuirá para esclarecimento dessa hipótese e melhor entendimento da imunopatologia induzida por esse vírus.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a resposta imune inata no SNC e alterações celulares induzidas pelo vírus Juruáçá em camundongos neonatos inoculados por via intranasal.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar as alterações histopatológicas em encéfalos de camundongos neonatos infectados com o vírus Juruáçá;
- Identificar diferentes perfis morfológicos de ativação microglial induzidos pelo vírus Juruáçá em encéfalos de camundongos neonatos;
- Analisar a produção de citocinas e óxido nítrico em camundongos neonatos infectados com o vírus Juruáçá;
- Analisar a produção de citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em culturas primárias de células do SNC infectadas com o vírus Juruáçá;
- Verificar se neurônios e oligodendrócitos são susceptíveis à infecção pelo vírus Juruáçá *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas e critérios estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança. O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) do IEC e foi aprovado sob parecer N° 0022/2012/CEUA/IEC/CENP/SVS/MS (Anexo C), para realização de procedimentos de isolamento e técnicas sorológicas destinadas a agentes infecciosos que pertencem a classe de risco 3.

Para manipulação do vírus em estudo, foram utilizados os equipamentos de proteção individual (EPIs) – óculos, tocas, máscara, luvas e jaleco – e os equipamentos de proteção coletiva (EPCs) – câmara de fluxo laminar do tipo II A2. Materiais biológicos desprezados e carcaças de animais utilizados neste trabalho foram acondicionados em recipientes apropriados e enviados para a incineração.

4.2 CEPA VIRAL

O vírus Juruacá (BE AN 401933) foi isolado pela SAARB do IEC em camundongos albinos suíços recém nascidos inoculados por via i. c. com homogeneizado de vísceras de um morcego capturado em 1982 na região de Porto Trombetas, município de Oriximiná, Estado Pará.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c fêmeas na 2ª semana de gestação para cultura de neurônios embrionários e recém nascidos com dois a três dias de idade para cultura primária mista de células gliais e para produzir homogeneizado de células do SNC. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais com mamadeiras de água filtrada *ad libitum*, alimentados com ração peletizada e observados diariamente. Os camundongos adultos foram eutanasiados em câmara de CO₂ com capacidade de 1.000 cm³ e suas carcaças foram embaladas adequadamente, armazenadas em freezer a uma temperatura aproximada de -20°C e posteriormente enviadas para incineração.

4.4 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.4.1 Produção de estoque viral

As suspensões virais foram produzidas, na proporção de 1:10, a partir da maceração de encéfalos de camundongos infectados com o vírus Juruaçá (8 d.p.i.) em solução de cloreto de sódio a 0,8% tamponada com fosfato (PBS) pH 7.2, contendo albumina bovina a 0,75%, estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100U/mL). O macerado foi centrifugado a 10000rpm por quinze minutos à 4°C e o sobrenadante transferido para recipientes apropriados. O volume de 0,02mL da suspensão foi inoculado por via i. c. com seringa hipodérmica no cérebro de camundongos da linhagem BALB/c neonatos (2 dias de idade).

Esses camundongos infectados com o vírus Juruaçá foram observados duas vezes ao dia e após manifestação dos sinais clínicos, como paralisia, tremores, retardo do crescimento, entre outros, foram identificados e congelados à -80°C no 8° d.p.i. para compor o estoque viral e posteriormente serem usados nos experimentos. Os animais do grupo controle foram apenas congelados sob a mesma temperatura que os camundongos infectados.

4.4.2 Titulação do estoque viral

A titulação do estoque viral foi realizada a partir do preparo de suspensões de encéfalo de camundongos infectados com o vírus Juruaçá (8 d.p.i.), preparadas como descrito no item 4.4. Essas suspensões foram utilizadas para preparar diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-10} , sendo inoculados 0,02mL de cada diluição por via i.c. em grupos de seis camundongos recém nascidos com dois dias de idade. O título viral foi calculado pelo método descrito por Reed e Muench (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02mL$, que representa a dose letal para 50% dos camundongos infectados.

4.4.3 Pesagem dos animais

Camundongos albinos da linhagem BALB/c neonatos (dois dias de idade) foram separados em grupo controle, inoculados por via i. n. com suspensões de encéfalos de camundongos não infectados, e grupo infectado, inoculados por via i. n. com suspensões de encéfalos de animais infectados com o vírus Juruaçá. Desde o primeiro dia até o décimo segundo dia após inoculação os camundongos foram pesados diariamente em balança (Bel

Engineering/EUA), sendo o 12º dia o período máximo de sobrevivência dos animais em decorrência da infecção.

4.4.4 Processamento histopatológico

Os camundongos recém-nascidos (dois dias de idade) divididos em grupo controle e grupo infectado foram inoculados por via i.n. com 0,02mL, sendo 0,01 mL em cada narina, de uma suspensão de encéfalo de camundongo não infectado e infectado com o espécime viral em estudo na proporção de 1:2, respectivamente. Após 4, 8 e 12 dias de infecção, três animais do grupo controle e três do grupo infectado de cada um desses tempos foram anestesiados com halotano (Halocarbon Laboratories) e perfundidos por via intracardíaca (ventrículo esquerdo) com solução de cloreto de sódio a 0,9%, contendo heparina, seguida de solução fixadora contendo 4% de formaldeído nascente em tampão fósforo a 0,1M, pH 7,2, a temperatura ambiente. Após perfusão, a calota craniana foi removida para a retirada do cérebro, o qual foi imerso na mesma solução fixadora por 48 horas. Ao final desse período, foram realizadas três lavagens com PBS, pH 7,2, a temperatura ambiente, seguida da desidratação em diluições crescentes de etanol (50%, 70%, 90%, e 100%), com três passagens em xilol a temperatura ambiente e imersão em dois banhos de parafina a 60°C. O processamento foi finalizado com a inclusão das amostras em blocos de parafina.

Os blocos foram seccionados com o auxílio de micrótomo rotativo (Leica/Suíça), obtendo-se cortes sagitais com espessura de 5 µm. Por fim, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina/Eosina (MICHALANY, 1998; PROPHET et al. 1992), seguida da observação ao microscópio óptico (Axiophot - Zeiss/Alemanha) e obtenção das imagens com máquina digital (AxioCam HRC - Zeiss/Alemanha).

4.4.5 Produção de soro homólogo

O soro homólogo foi produzido a partir de inoculações, por via intraperitoneal (i.p.), de 0,2mL de suspensões de encéfalo de camundongos infectados com o vírus Juruuá, preparadas em solução de cloreto de sódio a 0,8%, em camundongos albinos da linhagem BALB/c adultos com três a quatro semanas de idade. Foram feitas cinco inoculações em intervalo de uma semana cada e sete dias após a última inoculação, os animais foram anestesiados com halotano e sangrados por punção cardíaca. O sangue foi coletado e centrifugado a 3000rpm por dez minutos para obtenção do soro, o qual foi armazenado a -

20°C para uso posterior (CASALS, 1967). A especificidade do soro foi comprovada pelo teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando as diluições de 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

4.4.6 Processamento imunohistoquímico

Para cada experimento, camundongos albinos da linhagem BALB/c neonatos (dois dias de idade) foram distribuídos em dois grupos: 1) grupo controle com animais não infectados; 2) grupo infectado com animais inoculados por via i. n. com os vírus Juruaçá. Após completarem os tempos de infecção de 4, 8 e 12 d.p.i., os animais foram sacrificados e processados conforme a técnica citada abaixo.

4.4.6.1 Fixação por Perfusão e Microtomia

Os animais foram anestesiados com halotano (Halocarbon Laboratories) e perfundidos por via intracardíaca (ventrículo esquerdo), com solução de cloreto de sódio a 0,9% heparinizada, seguida de solução fixadora contendo formaldeído nascente a 4% em tampão fosfato a 0,1M. Após perfusão, os encéfalos foram retirados, examinados macroscopicamente e processados, como descrito no item 4.4.4. Em seguida, as amostras destinadas aos procedimentos imunohistoquímicos foram seccionadas a 5µm em micrótomo rotativo (Leica/Suíça), montados em lâmina, retirada a parafina com dois banhos em xilol a temperatura ambiente, seguido de reidratação em diluições decrescentes de etanol (100%, 90%, 70%, 50% e 30%) e dois banhos de água destilada.

4.4.6.2 Imunohistoquímica

Para a imunomarcção, foi utilizada a técnica de imunoperoxidase usando um kit comercial Vector Mouse on Mouse Basic Kit (M.O.M. kit – Vector Laboratories/EUA), seguindo instruções do fabricante com adaptações. Os cortes foram incubados com ácido bórico a 0,2M por uma hora para fazer a recuperação antigênica, permeabilizados com uma solução de Triton X100 a 0,5%, sítios inespecíficos bloqueados em solução contendo Mouse IgG Blocking Reagent, incubados em anticorpo primário por um dia, depois em anticorpo secundário por três horas (Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent), a peroxidase endógena foi

inativada com peróxido de hidrogênio a 0,3% e finalmente incubado com o reagente ABC por uma hora.

As reações imunohistoquímicas foram reveladas com solução reveladora DAB/níquel, montadas entre lâmina/lamínula com Entellan (Merk/Alemanha), analisadas em microscópio óptico de campo claro (Axiophot - Zeiss/Alemanha) e fotografados com câmera digital (AxioCam HRC - Zeiss/Alemanha). Os anticorpos primários utilizados nesses ensaios de imunomarcção foram anti-IBA-1 monoclonal feito em camundongo para a marcação de micróglia e o soro homólogo hiperimune anti-Juruaça feito em camundongo.

4.4.7 Testes para detecção de citocinas e NO

4.4.7.1 Preparo do homogeneizado de cérebros de camundongos

Camundongos albinos da linhagem BALB/c neonatos (dois dias de idade) foram inoculados por via i. n. com 0,02mL – 0,01mL em cada narina – de suspensões de cérebros de camundongos infectados com o espécime viral em estudo e não infectados na proporção de 1:2, preparadas como descrito no item 4.4. Os animais infectados e não infectados foram identificados e congelados à -80°C com 4, 8 e 12 d.p.i. Em seguida, foi feita a maceração do encéfalo desses camundongos em tampão PHEM 2X na proporção de 1:5 para serem utilizados nos experimentos de detecção de citocinas e NO.

4.4.7.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA do tipo sandwich)

Essa técnica foi realizada conforme instruções do fabricante do kit (BD OptEIA™ - BD Biosciences/EUA). Para analisar a expressão das citocinas IL-1 β , IL-12p₄₀, IL-10, IL-4, TGF- β 1 foram utilizados sobrenadantes de co-culturas de células do SNC de camundongos infectadas e não infectadas e homogeneizados de encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c infectados e do grupo controle (item 4.4.7.1).

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

As placas foram novamente lavadas como descrito anteriormente, seguida da adição dos sobrenadantes das co-culturas, das suspensões dos encéfalos de camundongos e das diluições seriadas da curva padrão; e incubação por duas horas em temperatura ambiente – para a quantificação da citocina TGF- β 1, as amostras foram previamente tratadas com ácido clorídrico (HCl) por uma hora e depois neutralizadas com hidróxido de sódio (NaOH) a 1N. Após esse intervalo, as placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com anticorpo de detecção biotilado acrescido de estreptavidina ligada a peroxidase por um período de uma hora a temperatura ambiente – a citocina IL-1 β necessita que o anticorpo de detecção seja adicionado uma hora antes do conjugado de estreptavidina-peroxidase, permanecendo esse último por 30 minutos na placa juntamente com as amostras. As placas foram lavadas e incubadas com o cromógeno (TMB - Tetrametilbenzidina) por 15-30 minutos a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após incubação, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2N e analisada na leitora de ELISA Modelo EL 800 - BIO-TEK com filtro de 450nm.

4.4.7.3 Citometria de fluxo

Essa técnica foi realizada conforme instruções do fabricante do kit (BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 - BD Biosciences/EUA). Para analisar a expressão das citocinas IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-10 e IL-4 foram utilizados sobrenadantes de co-culturas de células do SNC de camundongos infectadas e não infectadas e homogeneizados de encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c infectados e do grupo controle (item 4.4.7.1).

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

4.4.7.4 Reagente de Griess para quantificação de nitrito

Essa técnica foi realizada conforme instruções do fabricante do kit (Molecular Probes/EUA), com algumas modificações. Para quantificação de nitrito, formado pela

oxidação espontânea de NO sob condições fisiológicas, foram utilizados sobrenadantes de co-culturas de células do SNC de camundongos infectadas e não infectadas e homogeneizados de encéfalos de camundongos albinos da linhagem BALB/c infectados e do grupo controle (item 4.4.7.1). O limite de detecção para esse método é de 1,0 μM de nitrito.

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

4.5 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.5.1 Cultivos primários

4.5.1.1 Cultura primária de células gliais

Culturas mistas de células gliais foram preparadas como descrito por Moura Neto et al. (1983). Camundongos albinos da linhagem BALB/c recém nascidos (dois dias de idade) foram anestesiados com halonato (Halocarbon Laboratories) e eutanasiados. Após assepsia com álcool 70%, foram colocados em placa de Petri contendo solução salina (D-Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – D-PBS) misturada com D-glicose a 6%, os cérebros foram dissecados, as meninges e os vasos removidos sob ambiente estéril. Em tubos de 15mL, as células foram dissociadas mecanicamente em PBS utilizando pipetas de vidro tratadas com silicone e autoclavadas.

Após decantação do tecido não dissociado, o sobrenadante foi transferido para tubos de 15mL, centrifugado a 3000rpm por cinco minutos e o sedimento ressuspensionado em meio glial composto de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12), D-glicose a 6%, L-glutamina a 2mM, bicarbonato de sódio a 3mM, penicilina/estreptomicina a 0,5mg/mL e 10% de soro bovino fetal (SBF). Uma pequena alíquota da suspensão de células foi misturada ao

azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer. As células foram semeadas na densidade aproximada de 10^6 células sobre lamínulas em placas de 24 poços, sendo mantidas em incubadora à temperatura de 37°C , sob atmosfera úmida composta de 95% de ar atmosférico e 5% de CO_2 . As culturas foram monitoradas em microscópio invertido Axiovert 25 (Zeiss/Alemanha) e o meio trocado uma vez por semana.

Todas as lamínulas utilizadas nos cultivos primários foram previamente tratadas com solução de poly-L-lisina (PM. 30000 - 70000) na concentração de $6,25\mu\text{g/mL}$ ($0,3\text{mL/cm}^2$ área de superfície).

4.5.1.2 Cultura de neurônios embrionários

Para o cultivo de neurônios embrionários foi utilizada a técnica previamente descrita por Brewer (1995). Camundongos albinos fêmeas da linhagem BALB/c na 2ª semana de gestação foram anestesiados com halonato (Halocarbon Laboratories) e eutanasiados. O útero com os fetos (quinze a dezesseis dias de vida intra-uterina) foi extraído, sob condições estéreis, e colocado em uma placa de Petri contendo solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e suplementada com piruvato de sódio a $1,0\text{mM}$ e tampão HEPES a $10,0\text{mM}$.

Os fetos foram retirados e seus cérebros dissecados para a remoção das meninges e vasos. As células foram dissociadas mecanicamente em tubos de 15mL , contendo HBSS, com o auxílio de pipetas de vidro tratadas com silicone e autoclavadas; após decantação dos tecidos não dissociados, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1500g por cinco minutos. O sedimento foi ressuspensionado em meio Neurobasal suplementado com Glutamax ($0,5\text{mM}$), ácido glutâmico ($25\mu\text{M}$) e suplemento B27 (2%) e uma pequena alíquota da suspensão de células foi misturada ao azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer. As células foram semeadas sobre lamínulas em placas de 24 poços contendo meio Neurobasal (Gibco/EUA), na concentração aproximada de 10^6 , sendo mantidas nas mesmas condições descritas no item 4.5.1.1.

4.5.1.3 Co-cultura de células gliais e neurônios embrionários

Após o fechamento da monocamada dos cultivos primários de células gliais sobre lamínulas em placas de 24 poços, culturas de neurônios embrionários foram produzidas como descrito no item 4.5.1.2 e uma pequena alíquota da suspensão de células foi misturada ao azul de tripan para contagem em câmara de Neubauer. As células foram então semeadas sobre as

culturas mistas de células gliais na concentração aproximada de 10^6 , sendo mantidas sob as mesmas condições de cultivo descritas no item 4.5.1.1.

4.5.1.4 Cultura de oligodendrócitos

Garrafas de culturas primárias de células gliais com duas semanas de cultivo foram agitadas manualmente por alguns minutos para desprender as micróglias. O sobrenadante foi descartado, meio novo foi colocado nas garrafas e uma segunda agitação manual – com maior intensidade – foi realizada para desprender os oligodendrócitos. O sobrenadante foi coletado, transferido para tubos de 15mL e centrifugado a 1500g por cinco minutos. As células foram dissociadas e semeadas sobre lamínulas em placas de 24 poços na concentração aproximada de 10^6 células, em meio glial, sendo mantidas nas mesmas condições descritas no item 4.5.1.1.

4.5.2 Inoculação do vírus em cultivos primários

A inoculação do vírus Juruacá em co-culturas de células glias e neurônios embrionários foi feita três dias após a semeadura dos cultivos de neurônios; e em cultivos primários de oligodendrócitos foi feita uma semana após a preparação dessas culturas. Uma suspensão de encéfalo de camundongos infectados com o vírus Juruacá foi preparada como descrito no item 4.4.1, filtrada em filtros de $0,22\mu\text{m}$ e adicionada às co-culturas e culturas primárias mencionadas acima, sendo as mesmas observadas diariamente ao microscópio invertido Axiovert 25 (Zeiss/Alemanha). Os cultivos controles foram inoculados com suspensões de cérebro de camundongos não infectados.

4.5.3 Imunofluorescência indireta (IFI)

Foram utilizadas co-culturas de células glias e neurônios embrionários e culturas primárias de oligodendrócitos não infectadas e infectadas com o vírus Juruacá, crescidas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços para realização da técnica de IFI descrita por Gubler et al. (1984), com algumas modificações, objetivando identificar o tipo celular e detectar antígenos virais nesses cultivos primários. As células crescidas em lamínulas foram fixadas em formaldeído nascente a 4% por 30 minutos. Após fixação, as amostras foram lavadas com PBS a 1%, permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,1% em PBS e posteriormente incubadas em PBS-cloreto de amônio a 50mM por 30 minutos a temperatura

ambiente. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com solução contendo BSA a 1 % em PBS, pH 8,0 durante dez minutos. Após esse período, as amostras foram incubadas overnight com o anticorpo primário a uma temperatura de 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS, bloqueadas com BSA a 1% em PBS por 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário diluído em PBS e acrescido de marcador para núcleo celular por 60 minutos. O material foi lavado em BSA a 1% em PBS durante cinco minutos cada lavagem a temperatura ambiente. Depois, as lamínulas foram lavadas em PBS, sob as mesmas condições de tempo e temperatura, e rapidamente em água destilada, sendo posteriormente montadas em lâminas com Prolong Antifade (Invitrogen/EUA). As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência (Axiophot - Zeiss/Alemanha), e as imagens obtidas por uma câmera digital (AxioCam HRC - Zeiss/Alemanha). As imagens de duplas e triplas marcações foram processadas no software Adobe Photoshop CS5.

Anticorpos primários: soro hiperimune anti-vírus Juruacá, anti-GFAP (marcador de astrócito), anti-CNPase (marcador de oligodendrócitos). Anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 (verde) e Alexa Fluor 568 (vermelho) (Invitrogen/EUA). Marcador de micróglia: Isolectina B4 conjugada com isotiocianato de fluoresceína. Marcador de núcleo celular: corante fluorescente azul Hoechst 33258 ou iodeto de propídio.

4.5.4 Detecção de radicais superóxido em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários

As co-culturas de células gliais e neurônios embrionários foram cultivadas em lamínulas redondas, inoculadas com homogeneizado de encéfalo de camundongos não infectados e infectados com o vírus Juruacá, posteriormente coletadas nos tempos de 4, 8 e 12 d.p.i. Depois, foram lavadas com PBS e incubadas em meio de cultura DMEM-F12 contendo 1mg/ml de Nitroblue Tetrazolium (NBT). Após 1 h de incubação em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂, as co-culturas foram lavadas com meio de cultura DMEM-F12 e fixadas durante 30 minutos com formaldeído nascente a 4% em tampão PHEM. As lamínulas foram colocadas em estufa a 60°C para secar e, então, foram montadas em lâminas de vidro, utilizando Entellan (Merk/Alemanha) como meio de montagem. Após a montagem, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axiophot - Zeiss/Alemanha), fotografadas em preto e branco com câmera digital (AxioCam HRC - Zeiss/Alemanha) e as imagens avaliadas no software ImageJ para quantificar a intensidade do produto da reação resultante da redução do NBT (cor amarela) em formazan (cor azul).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Três experimentos foram realizados para analisar quantitativamente o peso e a produção de citocinas, nitrito e ROS em co-culturas de células do SNC e homogeneizado de encéfalos de camundongos não infectados e infectados com o vírus Juruuçá. A partir dos resultados foi feita análise estatística no software GraphPad Prism 5 utilizando o teste ANOVA *Two-way*, pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A idéia desse trabalho surgiu da necessidade de comprovar a hipótese levantada no estudo de Araújo (2006), o qual sugeriu que a infecção experimental por via i. c. com vírus Juruaçá causou uma doença inflamatória intensa em camundongos neonatos, que levou ao óbito 100% dos camundongos infectados no 7º d.p.i. Tal hipótese foi levantada a partir das observações ultraestruturais e de cortes histopatológicos que demonstraram uma extensa destruição do parênquima cerebral que, dentre outras manifestações, apresentou intensa reatividade glial e neurônios com aspecto apoptótico. No entanto, em culturas primárias de células do SNC infectadas com o vírus Juruaçá, apesar da detecção de antígenos e partículas virais, não foi observado ECP evidente. Diante dessas evidências, acreditamos que uma análise da resposta imunológica no SNC desses animais pode contribuir para confirmação da referida hipótese. Para analisarmos essa resposta usamos como referência imunomarcção de micróglia e expressão de citocinas, NO e ROS.

5.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

5.1.1 Susceptibilidade dos camundongos e titulação viral

Os camundongos albinos da linhagem BALB/c neonatos inoculados por via i. n. com homogeneizado de encéfalo de camundongos apresentaram susceptibilidade à infecção provocada pelo vírus Juruaçá. Os animais manifestaram alguns sinais clínicos, como tremores e paralisia, que culminaram com a morte dos mesmos no 12º d.p.i. O título viral dos camundongos infectados foi de 5,6 DL₅₀/0,02mL.

5.1.2 Peso dos animais

Os camundongos foram separados em grupo infectado e grupo controle, inoculados por via i. n. com homogeneizado de encéfalo de animais não infectados e infectados pelo vírus Juruaçá e observados ao longo de doze dias, período em que os animais vão a óbito. Os animais infectados começaram a demonstrar sinais da doença a partir do primeiro dia após a infecção com o vírus em estudo, apresentando perda de massa corporal, hipodesenvolvimento e dificuldade de alimentação. No 9º dia de infecção, os animais passaram a apresentar os

sinais de hipoatividade, tremores e dificuldade de locomoção, que foram intensificados até o 12º dia de infecção.

Os camundongos do grupo controle e grupo infectado foram pesados diariamente para verificar o ganho e perda de massa corporal, respectivamente, durante os doze dias. Constatou-se que os camundongos infectados apresentaram ganho de peso menor até o 8º d.p.i. em comparação aos animais do grupo controle, sendo que essa diferença de peso passa a ser significativa a partir do 7º d.p.i. A partir do 9º d.p.i., nota-se que os animais do grupo infectado passam a perder peso até o 12º d.p.i. (Figura 5 e 6).

Peso dos animais ao longo do tempo

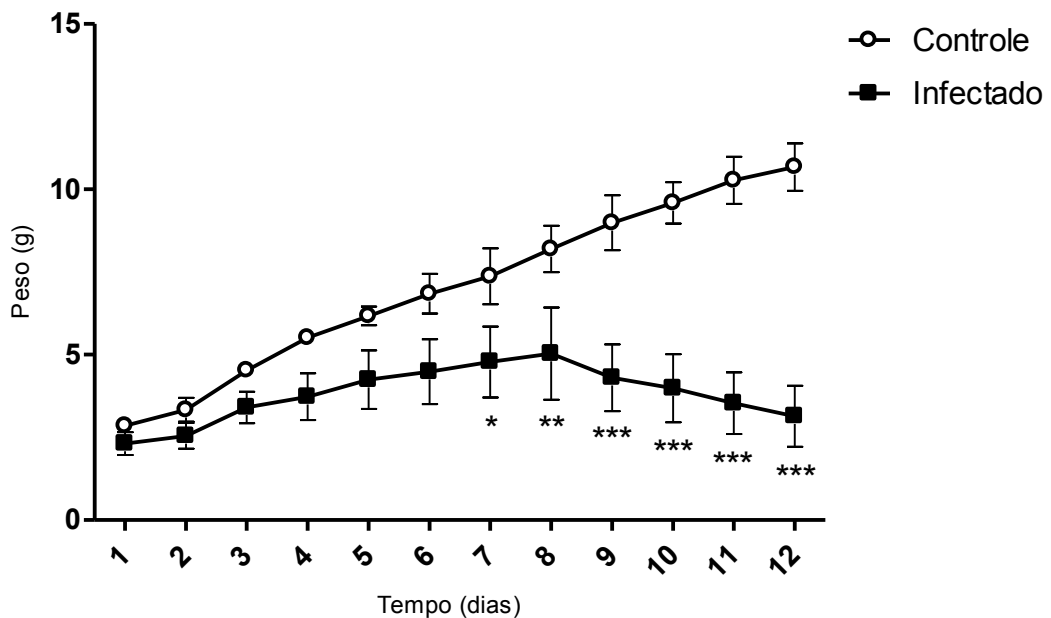


Figura 5 – Análise estatística da perda de peso de camundongos albinos da linhagem BALB/c durante 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 1 a 12 = 1 d.p.i. a 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$, quando comparados com o grupo controle.

Peso dos animais

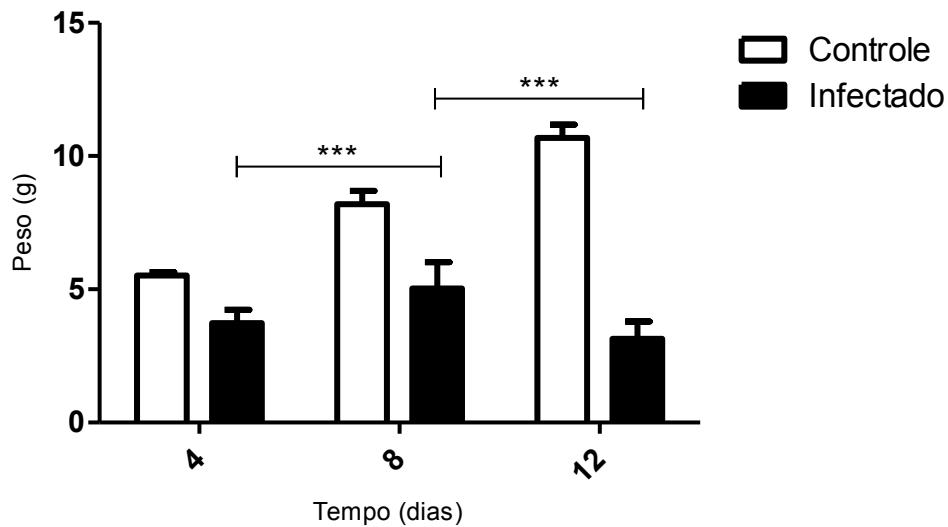


Figura 6 – Análise estatística da perda de peso de camundongos albinos da linhagem BALB/c no 4º, 8º e 12º d.p.i. do vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4º d.p.i., 8 = 8º d.p.i. e 12 = 12º d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) $p < 0,001$.

5.1.3 Análise histopatológica e aspectos morfológicos da reação microglial

Secções dos encéfalos de camundongos não infectados e infectados com o vírus Juruacá foram obtidas no 4º, 8º e 12º d.p.i. e submetidas à análise histopatológica. Nos animais pertencentes ao grupo controle não foram observadas alterações; enquanto que, nos animais infectados, várias alterações foram identificadas, cuja intensidade e frequência aumentaram ao longo do tempo de infecção.

No 4º d.p.i., observou-se congestão vascular, caracterizada histologicamente pelo acúmulo de hemácias nos vasos sanguíneos, na região cortical e principalmente entre as membranas meníngeas; além disso, foi observado infiltrado leucocitário no plexo coróide do quarto ventrículo e raras células com aspecto apoptóide localizadas no córtex cerebral, apresentando condensação citoplasmática e picnose (Figura 7).

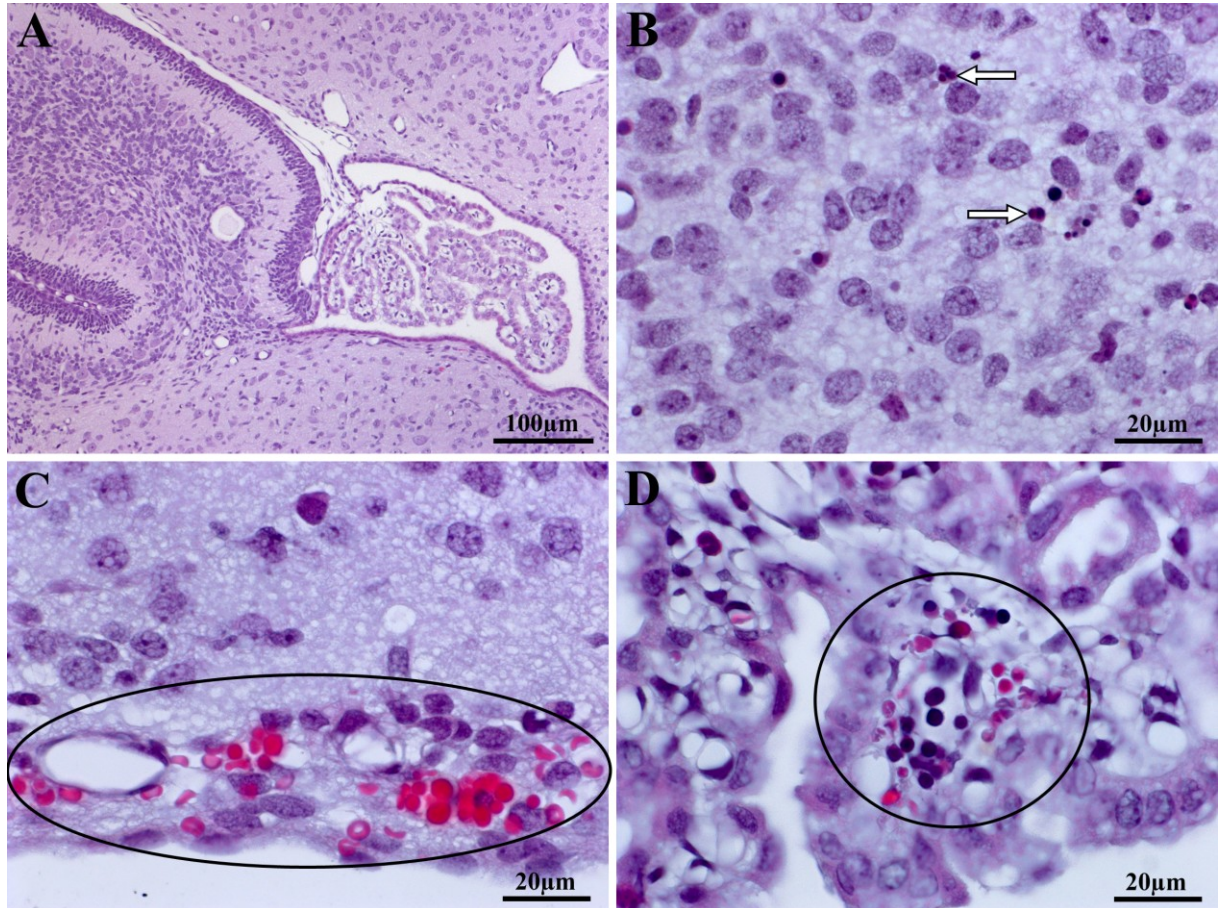


Figura 7 – Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A) e grupo infectado com o vírus Juruçá (B, C e D) no 4º d.p.i. coradas por hematoxilina eosina (HE). (A) Animal do grupo controle demonstrando a integridade do tecido. (B) Células com aspecto apoptóide na região cortical (setas brancas), (C) congestão entre as membranas meníngeas (elipse) e (D) infiltrado leucocitário no plexo coróide do quarto ventrículo (círculo).

No 8º d.p.i., verificou-se congestão intraparenquimatosa tanto no córtex quanto no cerebelo e congestão focal nos plexos coróides dos ventrículos laterais, terceiro e quarto ventrículo; além de rara marginação leucocitária, corpos apoptóticos distribuídos pelo bulbo olfatório e região cortical, edema com aspecto vacuolar localizado no córtex cerebral e edema perivascular no cerebelo (Figura 8).

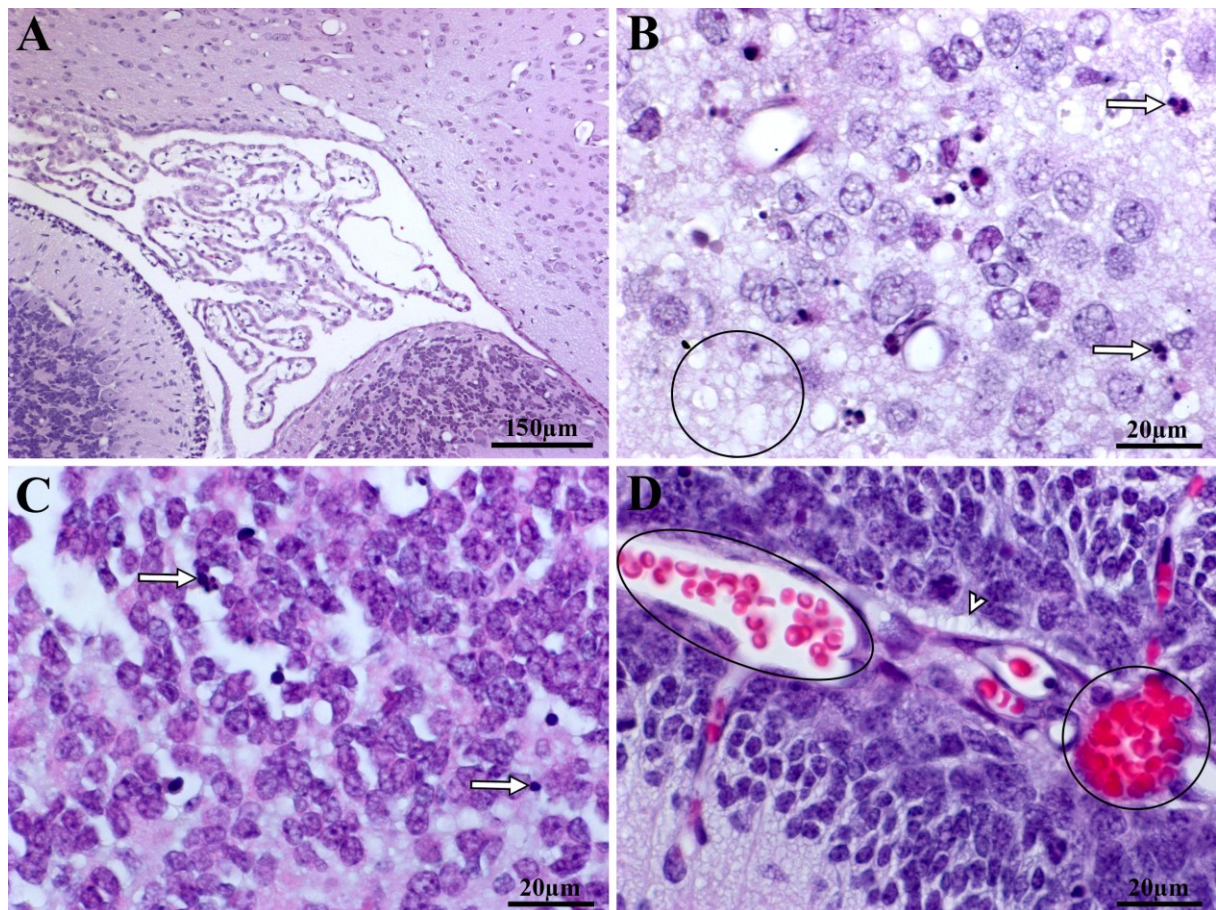


Figura 8 – Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A) e grupo infectado com o vírus Juruaçá (B, C e D) no 8º d.p.i. coradas por hematoxilina eosina (HE). (A) Animal do grupo controle demonstrando a integridade do tecido. (B) Células com morfologia apoptóide (setas brancas) e edema com aspecto vacuolar (círculo) na região cortical do encéfalo. (C) Presença de corpos apoptóticos no bulbo olfatório (setas brancas), além de (D) congestão no cerebelo (elipse e círculo) e edema perivascular (cabeça de seta branca).

As lesões intensificaram-se drasticamente no 12º d.p.i. Foi observada congestão vascular entre as membranas da meninge, nos plexos coróides, no bulbo olfatório e na região cortical. O córtex foi a região mais afetada. Nesta região verificou-se edema com aspecto vacuolar e necrose do tipo coagulativa distribuídas por todo o parênquima, com presença de picnoses e cariorréxis nuclear; alterações celulares tanto neuronais quanto gliais com grande quantidade de corpos apoptóticos, distribuídas em um espectro que variou de condensações pontuais no citoplasma até ampla condensação em estágios mais avançados de morte celular. Além disso, foram observadas células com aspecto semelhante a macrófagos ativados; reação glial com presença de astrócitos gemistocísticos, com núcleo excêntrico, citoplasma abundante, hialino e prolongamentos típicos; infiltrado leucocitário; e focos hemorrágicos perivasculars no parênquima cortical, caracterizados pela presença de hemácias fora da luz dos vasos sanguíneos (Figura 9).

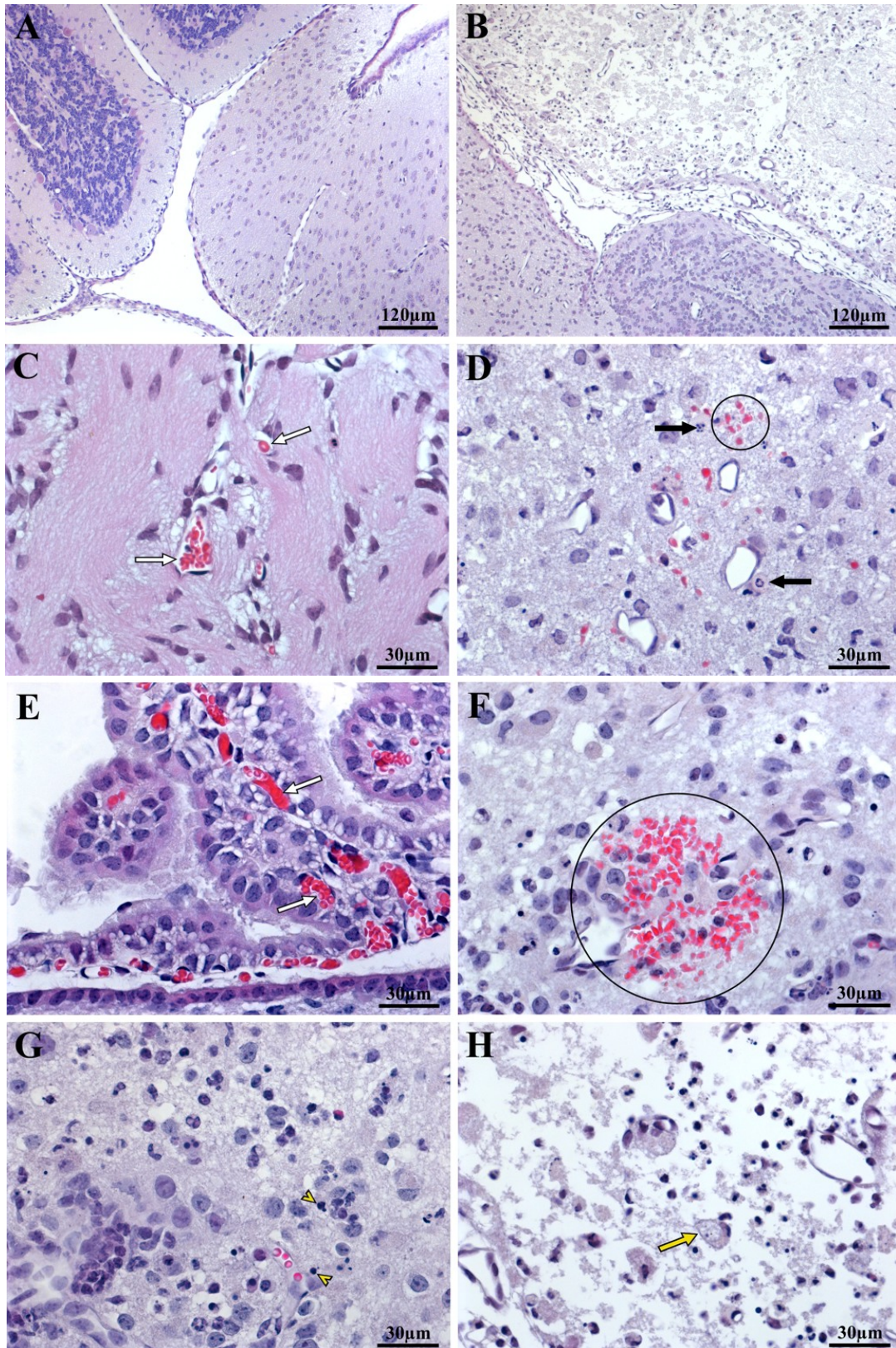


Figura 9 – Fotomicrografias de seções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A) e grupo infectado com o vírus Juruacá (B, C, D, E, F, G e H) no 12º d.p.i. coradas por hematoxilina eosina (HE). (A) Animal do grupo controle demonstrando a integridade do tecido. (B) Diferença entre o córtex e o mesencéfalo, mostrando maior destruição no parênquima cortical. (C) Congestão no bulbo olfatório (setas brancas); (D) presença de cariorréxis (setas pretas) e hemorragia no diencefalo (círculo); (E) e congestão no plexo coróide do quarto ventrículo (setas brancas). Na região cortical, foi observada (F) hemorragia no parênquima (círculo); (G) presença de corpos apoptóticos (cabeças de setas amarelas); (H) e células semelhantes a macrófagos (seta amarela).

Secções dos encéfalos de camundongos do grupo controle e do grupo infectado com o vírus Juruaçá foram obtidas e submetidas aos testes de imunohistoquímica no 8º d.p.i. para detecção de antígenos virais (Figura 10) e no 12º d.p.i. para identificação de células microgliais em estado de repouso, reativo ou ativado (Figura 11, 12 e 13).

O soro homólogo utilizado nesses experimentos foi titulado em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários e apresentou reação positiva até a diluição de 1:100, sendo a mesma estabelecida para a realização dos ensaios mencionados acima.

No 8º d.p.i., os animais pertencentes ao grupo infectado apresentaram marcação de antígenos virais distribuída por todo o encéfalo desde o bulbo olfatório, que foi a via de entrada, até a porção anterior da medula.

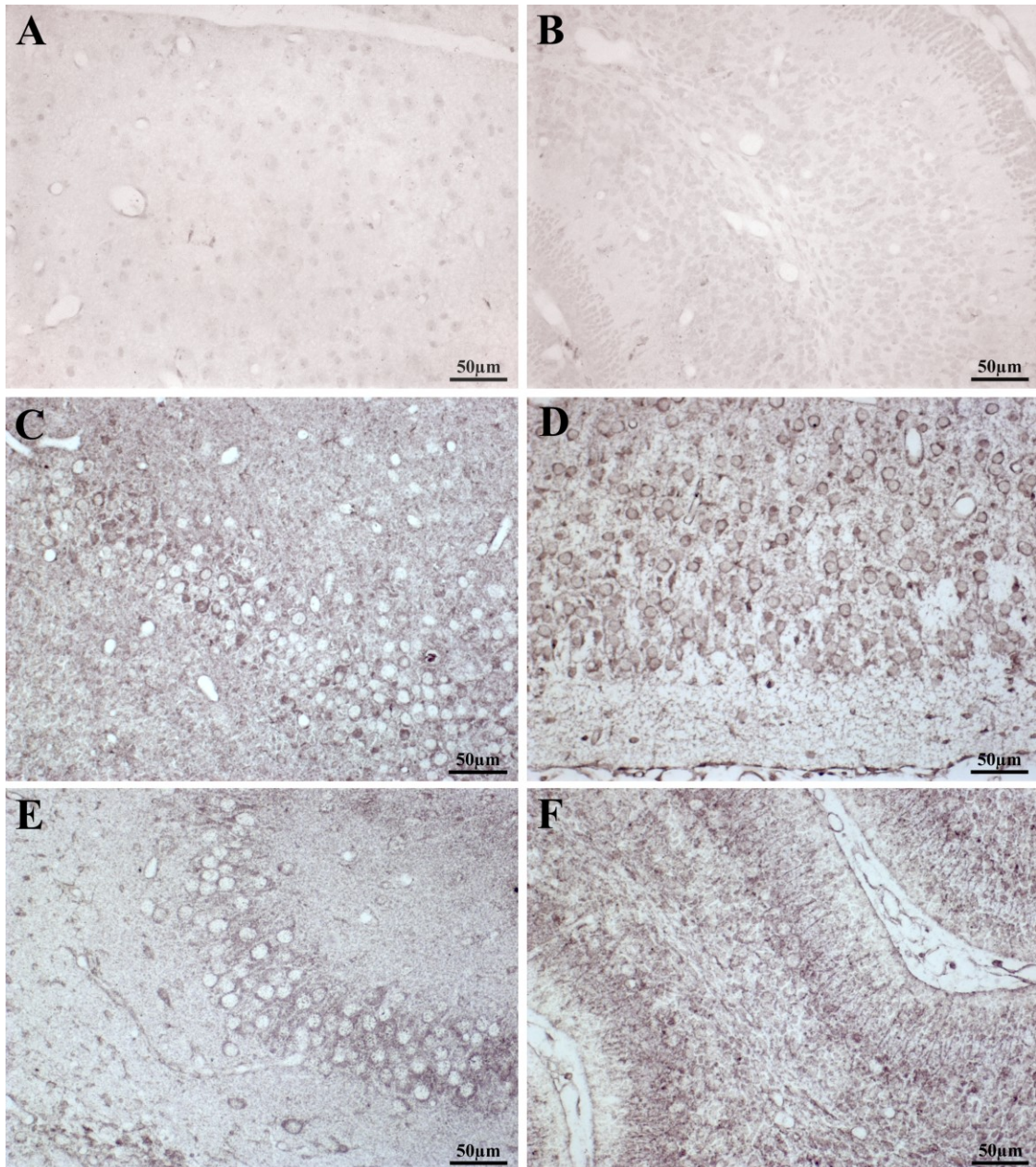


Figura 10 – Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle (A e B) e grupo infectado com o vírus Jiruaça (C, D, E e F) no 8º d.p.i. marcadas com anticorpo anti-Jiruaça por imunohistoquímica. (A) e (B) Animal do grupo controle demonstrando ausência de marcação no córtex e no cerebelo, respectivamente. (C), (D), (E) e (F) Animal infectado mostrando marcação de antígenos virais no bulbo olfatório, no córtex, no hipocampo e no cerebelo, respectivamente.

No 12° d.p.i., o encéfalo dos animais infectados e do grupo controle apresentou grandes modificações no perfil de ativação das células microgliais. As micróglias demonstraram morfologia com corpo celular pequeno e ramificações longas e delgadas nos camundongos do grupo controle, aspecto característico de uma célula microglial quiescente. Já nos animais infectados, em resposta a infecção viral, essas células apresentaram tanto aspecto reativo com soma aumentado, ramos curto e espessos, quanto aspecto ativado no qual se observa uma forma arredondada e ausência de ramos. No bulbo olfatório, núcleo olfatório anterior, prosencéfalo e diencéfalo próximo ao ventrículo lateral foram encontradas micróglias reativas, predominantemente, e ativadas. Na região cortical praticamente todas as células microgliais encontraram-se no estado ativado. Nas demais regiões do encéfalo, predominaram micróglias reativas (Figuras 11, 12 e 13).

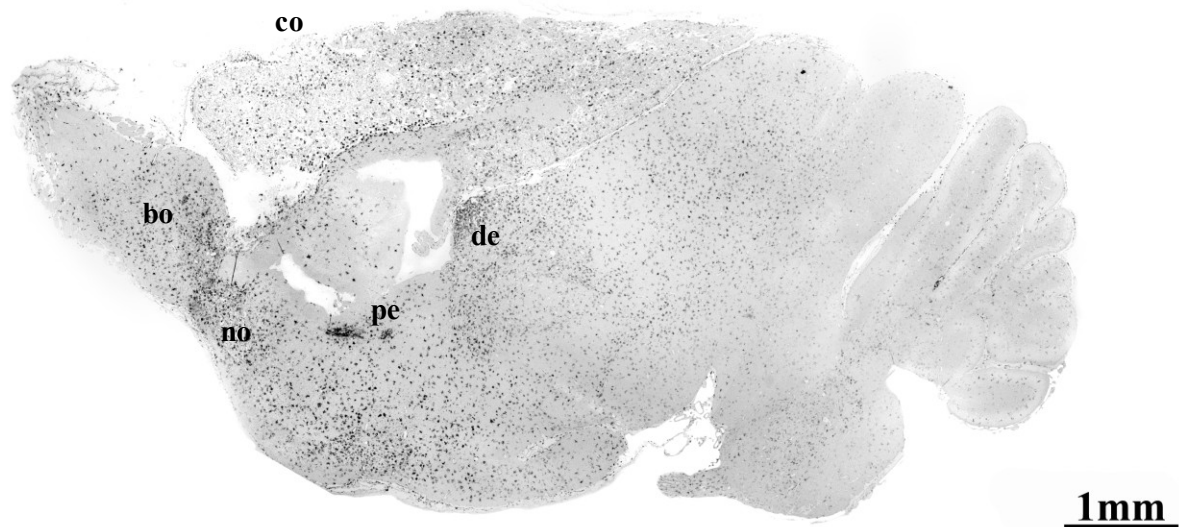


Figura 11 – Fotomicrografia de secção histológica do encéfalo de camundongos infectados com o vírus Juruacá no 12° d.p.i. corada por imunohistoquímica, mostrando uma visão panorâmica da distribuição de micróglias pelas diversas regiões encefálicas, onde co = córtex, bo = bulbo olfatório, no = núcleo olfatório, pe = prosencefalo e de = diencéfalo.

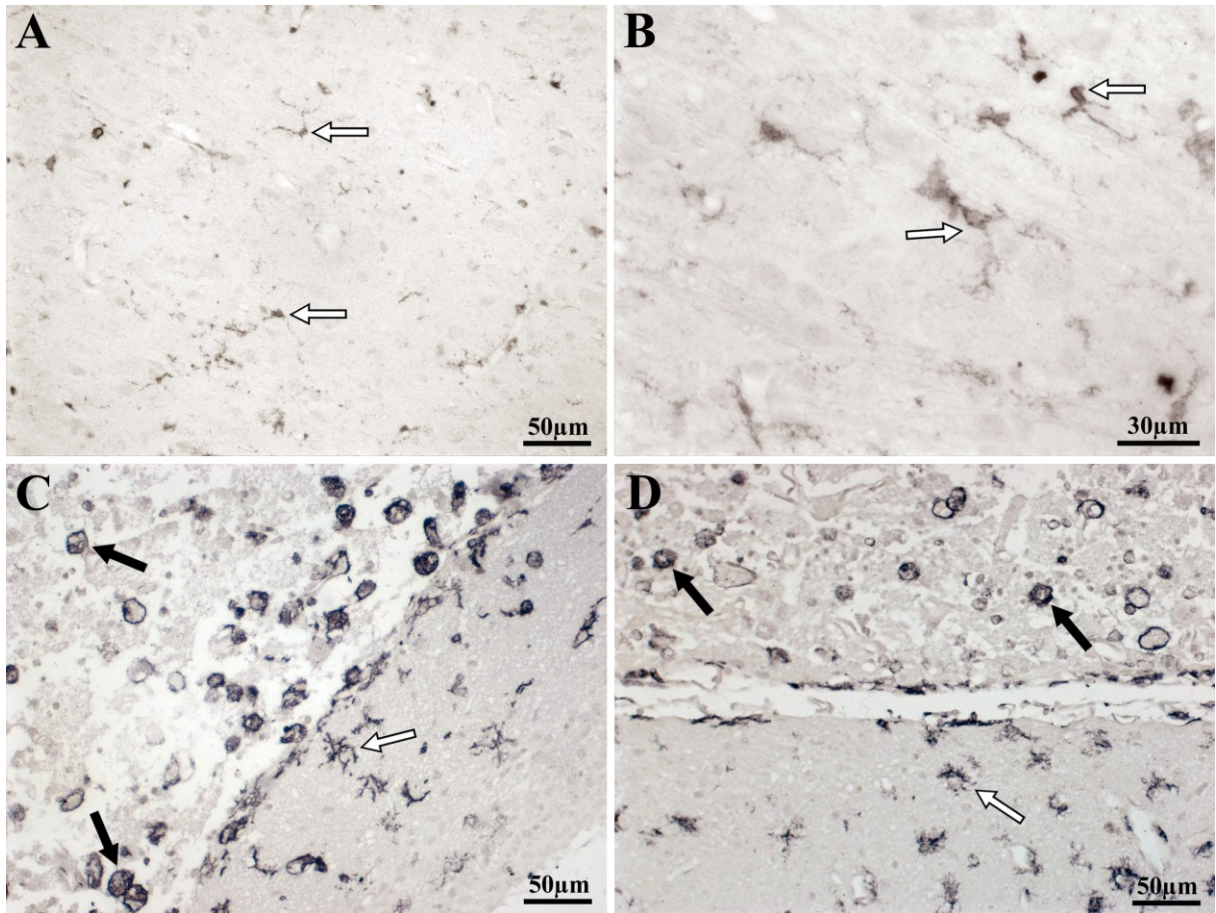


Figura 12 – Fotomicrografias de seções histológicas do encéfalo de camundongos do grupo controle e grupo infectado com o vírus Juruacá no 12º d.p.i. marcadas com Iba-1 por imunohistoquímica. (A) e (B) Animal do grupo controle demonstrando morfologia ramificada das células microgliais (setas brancas). (C) Diferença entre o córtex e a região próxima ao ventrículo lateral e (D) entre a região cortical e o mesencéfalo, demonstrando as mudanças morfológicas das micróglias no estado de repouso (seta brancas das figuras A e B), no estado reativo (setas brancas das figuras C e D) e no estado ativado (aspecto arredondado) (setas pretas).

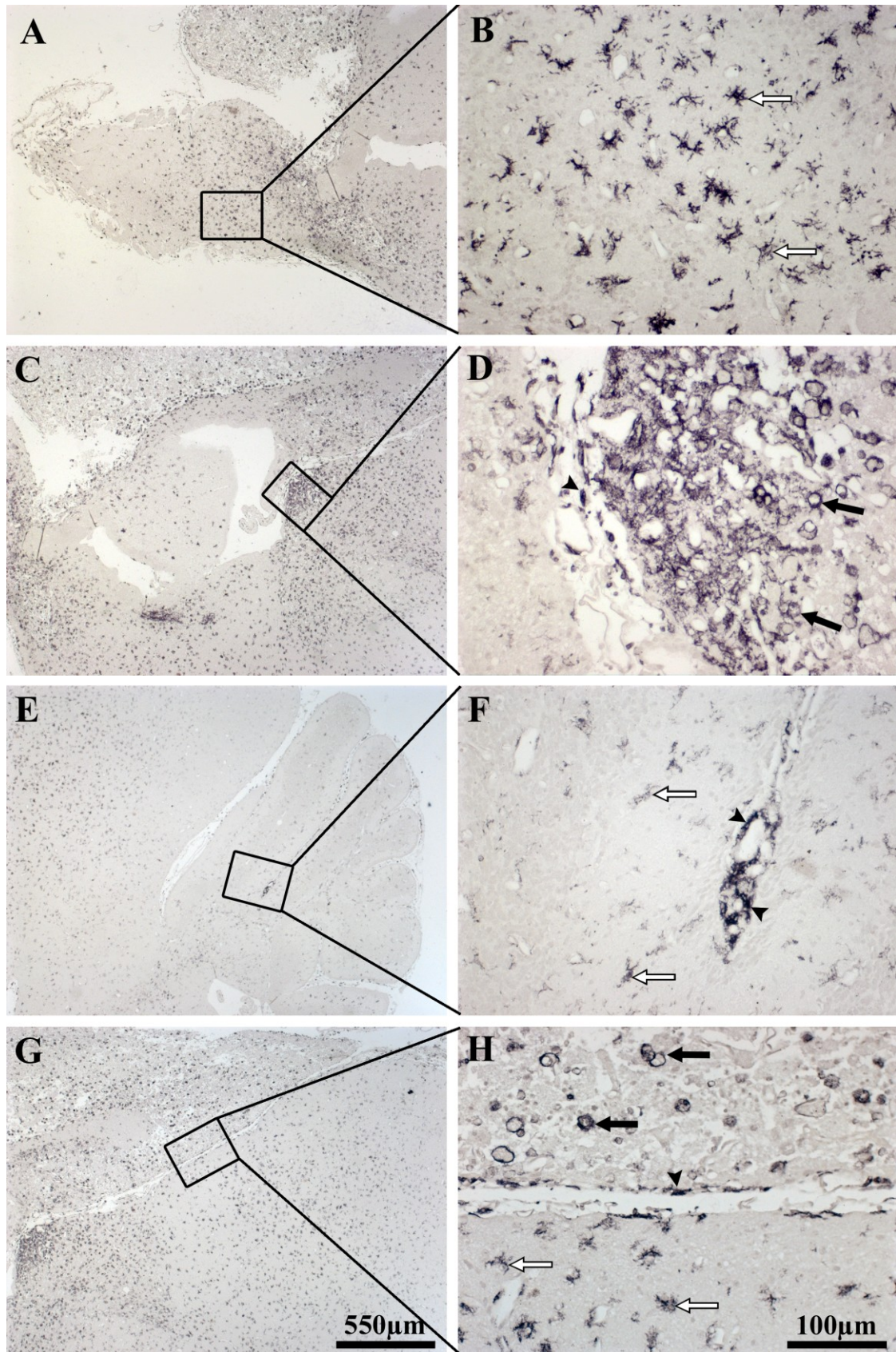


Figura 13 – Fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de camundongos infectados com o vírus Jiruaça no 12º d.p.i. marcadas com Iba-1 por imunohistoquímica. (A), (C), (E) e (G) Presença de células microgliais no bulbo olfatório, na região próxima ao ventrículo lateral, no cerebelo e entre córtex e mesencéfalo, respectivamente. (B), (D), (F) e (H) Imagem ampliada das figuras A, C, E e G, respectivamente, mostrando micróglia com morfologia ramificada (setas brancas), com aspecto arredondado (setas pretas) e marcação nas membranas das meninges (cabeças de seta pretas).

5.1.4 Produção de citocinas

Os ensaios imunoenzimáticos (por ELISA e CBA) para dosagem das citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias foram realizados a partir de homogeneizados de encéfalo de camundongos e de sobrenadantes de co-culturas de células gliais e de neurônios embrionários do grupo controle e infectado com o vírus Juruuçá, coletados após 4, 8 e 12 dias de inoculação. Os resultados com os sobrenadantes de cultura primária não foram significativos em função das grandes variações na detecção das citocinas nos três experimentos realizados.

A análise da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p₄₀ e IL-6 em homogeneizados de encéfalo de camundongos do grupo controle não mostrou diferenças significativas entre os animais no 4º, 8º e 12º d.p.i. Já nos animais do grupo infectado, foi observado aumento significativo no 8º d.p.i. e no 12º d.p.i. quando comparado com os grupos controles. No 12º dia de infecção, foi observada redução significativa da síntese de ambas as citocinas em relação ao grupo infectado do 8º d.p.i. (Figura 14 e 15).

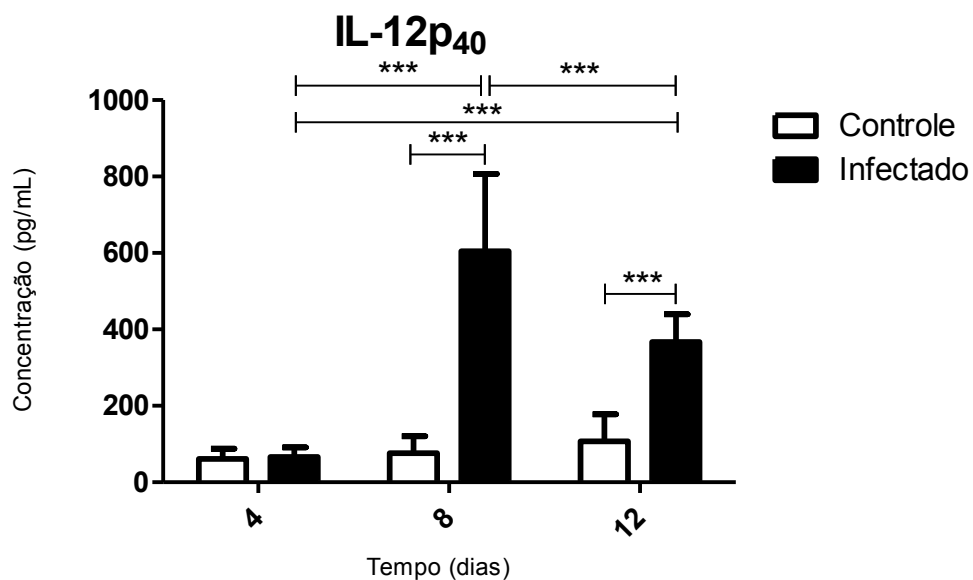


Figura 14 – Análise estatística da produção da citocina IL-12p₄₀ no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruuçá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) = p < 0,001.

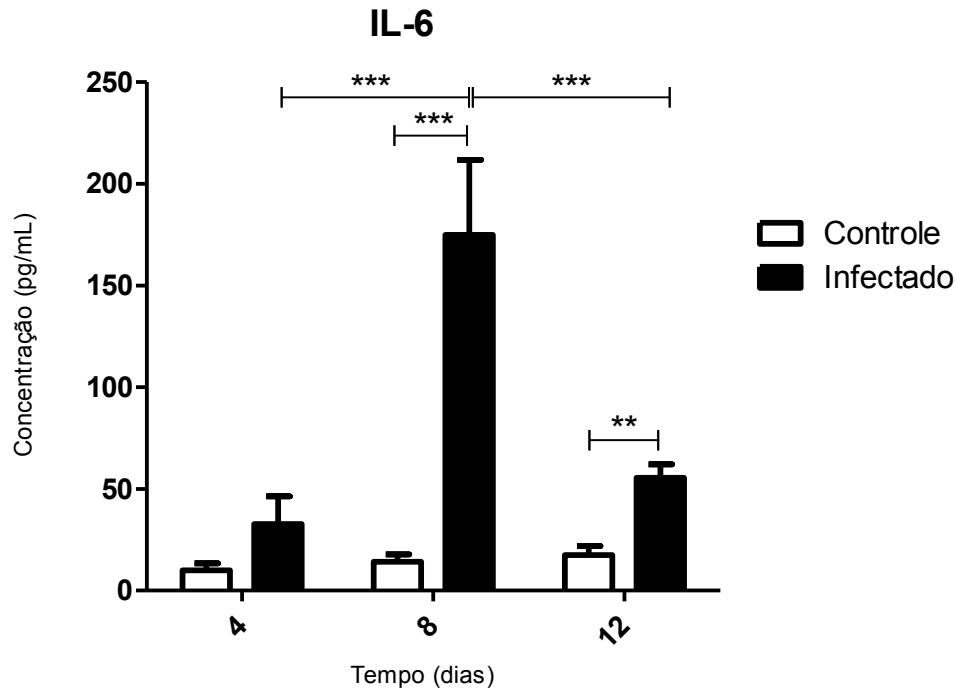


Figura 15 – Análise estatística da produção da citocina IL-6 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) = $p < 0,001$ e (**) = $p < 0,01$.

Os resultados da detecção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ não mostrou diferença significativa entre os animais do grupo controle no 4º, 8º e 12º d.p.i. No entanto, os animais infectados mostraram aumento significativo dessas citocinas no 8º d.p.i. e no 12º d.p.i. quando comparado com os grupos controle e com os animais no 4º dia de infecção (Figuras 16 e 17).

Apesar de não apresentar significância estatística, a citocina IFN- γ , mostrou uma produção elevada desde o 4º de infecção em relação ao grupo controle do mesmo período, provavelmente devido ao desvio padrão (Figura 17).

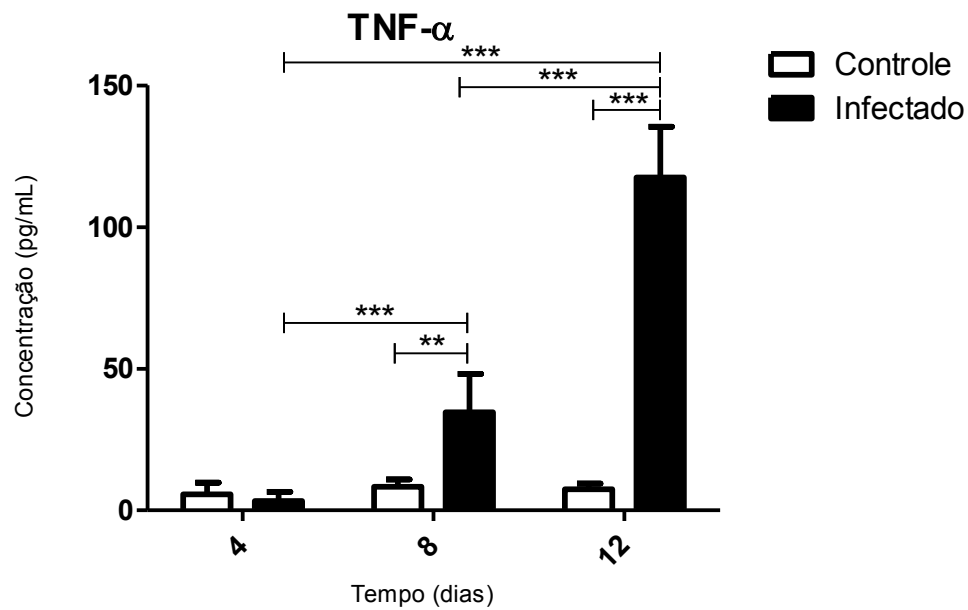


Figura 16 – Análise estatística da produção da citocina TNF- α no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) = $p < 0,001$ e (**) = $p < 0,01$.

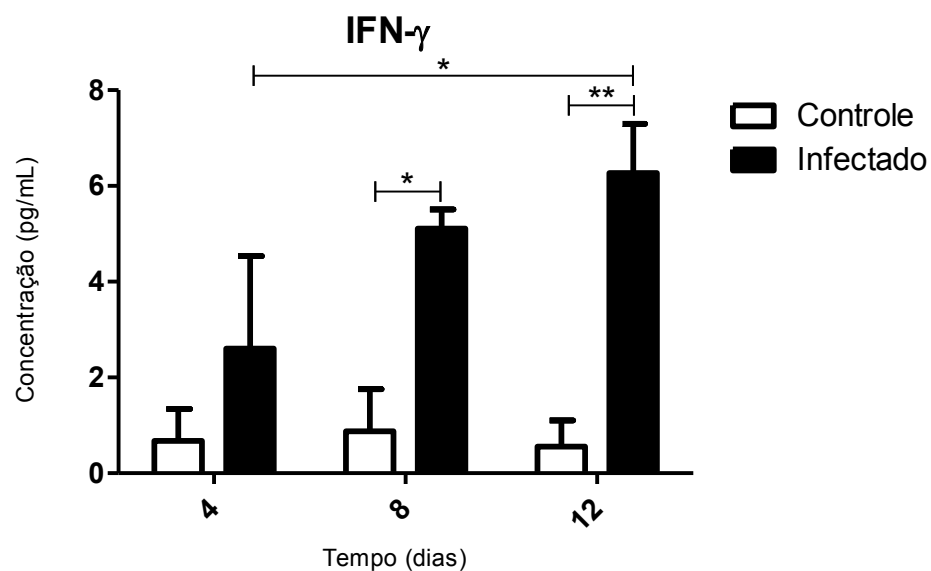


Figura 17 – Análise estatística da produção da citocina IFN- γ no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (**) = $p < 0,01$ e (*) = $p < 0,05$.

A análise da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β não mostrou diferença significativas entre os animais do grupo controle no 4 $^{\circ}$, 8 $^{\circ}$ e 12 $^{\circ}$ d.p.i. Nos animais do grupo infectado, porém, foi observado aumento significativo somente no 8 $^{\circ}$ d.p.i. em relação ao grupo controle e aos demais tempos analisados (Figura 18).

As citocinas IL-17A e IL-2 detectadas por citometria de fluxo não apresentaram diferença estatística em relação aos tempos analisados (dados não mostrados).

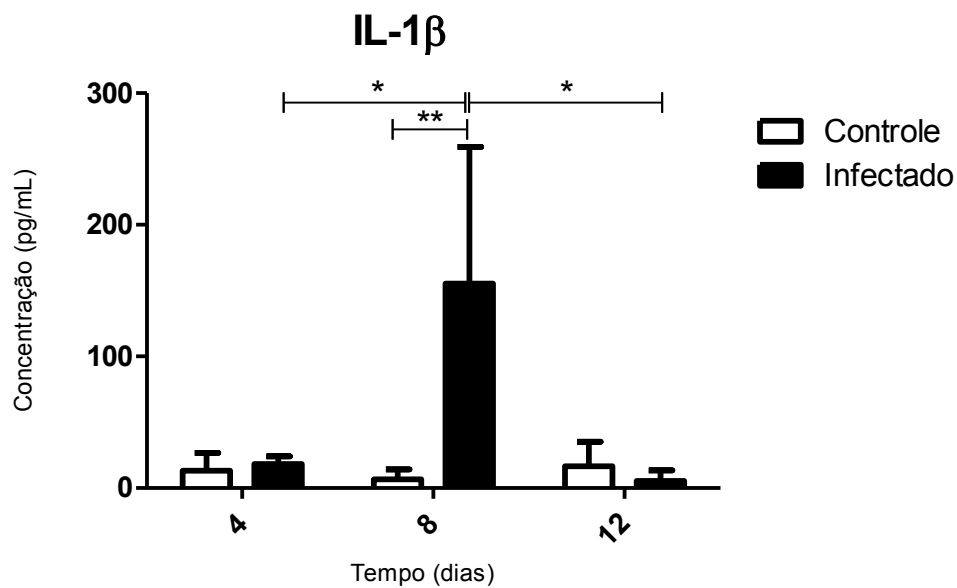


Figura 18 – Análise estatística da produção da citocina IL-1 β no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (**) = $p < 0,01$ e (*) = $p < 0,05$.

Os resultados da detecção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 demonstram redução na síntese de ambas ao longo da infecção.

A produção da citocina IL-10 foi reduzida significativamente em relação ao grupo controle somente no 12 $^{\circ}$ d.p.i. Quando comparamos o grupo infectado no 12 $^{\circ}$ d.p.i. com o 4 $^{\circ}$ e o 8 $^{\circ}$ d.p.i., foi observada redução na produção desta citocina (Figura 19). A citocina IL-4, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre os grupos infectados e grupo controle nos períodos de tempos avaliados. No entanto, houve redução significativa da produção desta citocina no grupo infectado do 12 $^{\circ}$ d.p.i., quando comparado com os demais grupos infectados (Figura 20). Não foi possível detectar a produção da citocina TGF- β 1 por meio das técnicas utilizadas nesse trabalho.

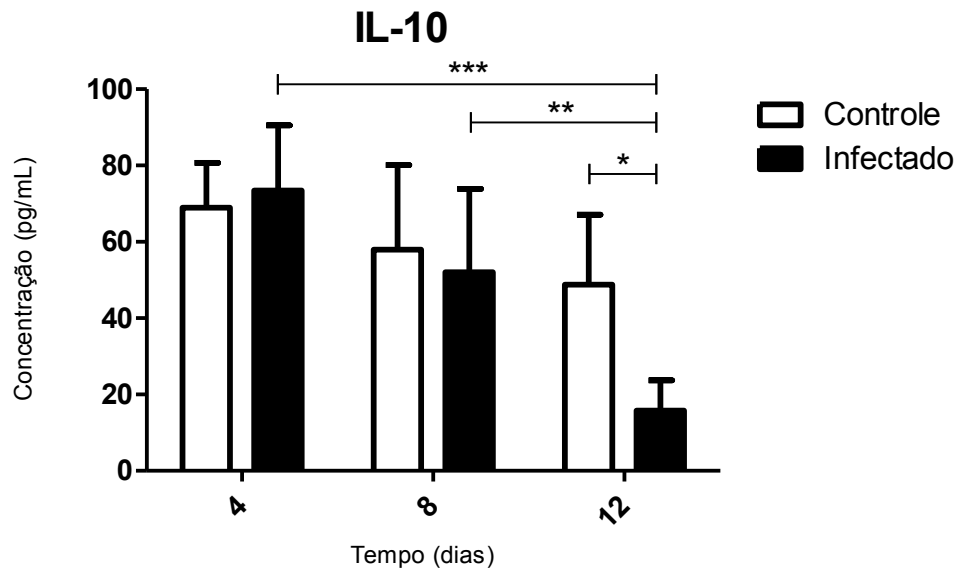


Figura 19 – Análise estatística da produção da citocina IL-10 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$; e (*) = $p < 0,05$.

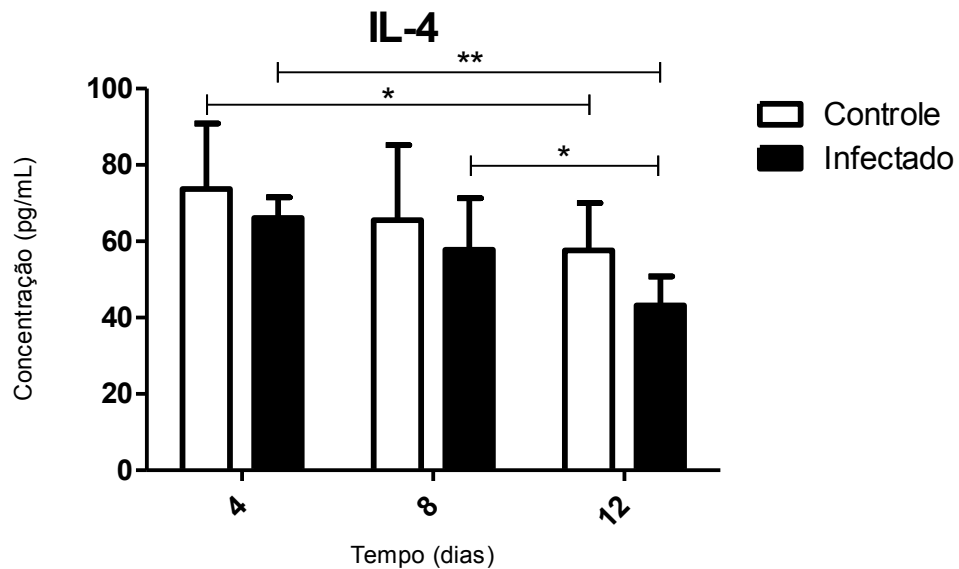


Figura 20 – Análise estatística da produção da citocina IL-4 no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (**) = $p < 0,01$ e (*) = $p < 0,05$.

5.1.5 Produção de óxido nítrico (NO)

A análise da produção de NO por meio da quantificação de nitrito foi realizada a partir de sobrenadantes de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários e de homogeneizados de encéfalo de camundongos do grupo controle e do grupo infectado com o vírus Juruuaá, coletados após 4, 8 e 12 dias de inoculação. Os resultados com os sobrenadantes de cultura primária não foram significativos em função das grandes variações na detecção de NO nos três experimentos realizados.

Os experimentos realizados com homogeneizados de encéfalo de camundongos mostraram que o grupo infectado apresentou uma redução na síntese de NO em relação aos animais do grupo controle, sendo essa redução significativa apenas no 12º d.p.i., quando comparado aos animais do grupo controle do mesmo período de tempo. Além disso, foi observado que os camundongos do grupo controle apresentaram aumento significativo ao longo do período de desenvolvimento dos animais analisados (Figura 21).

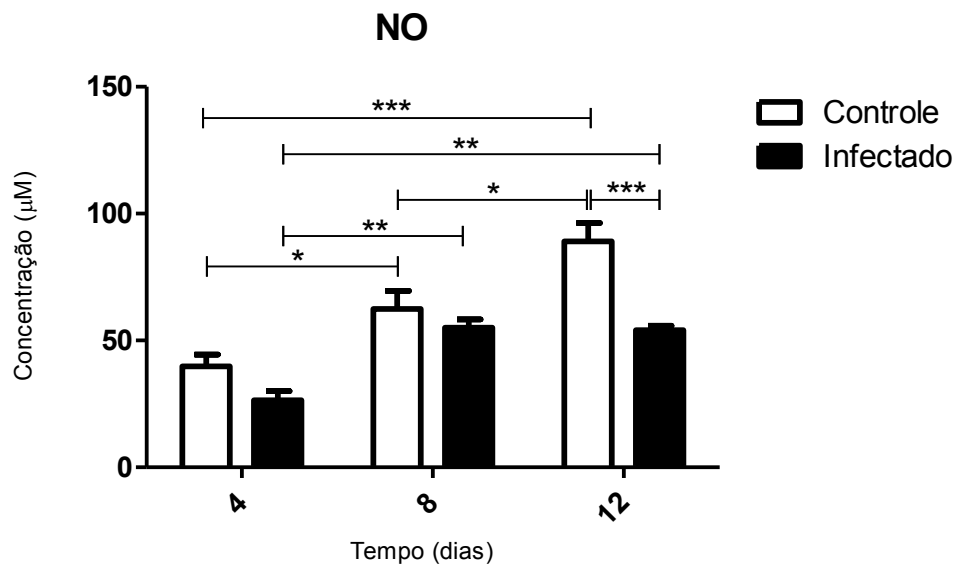


Figura 21 – Análise estatística da quantificação de nitrito para detecção de NO no SNC de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruuaá. Controle = grupo controle; Infectado = grupos infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$; e (*) = $p < 0,05$.

5.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

5.2.1 Detecção de marcadores de células gliais, antígenos virais e iNOS

Nos experimentos para imunomarcação de células do SNC e antígenos do vírus Juruacá foram realizados ensaios citoquímicos e de imunofluorescência indireta em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., com o intuito de verificar se micróglias, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios de camundongos albinos neonatos da linhagem BALB/c eram susceptíveis a infecção pelo vírus Juruacá.

O soro homólogo utilizado nesses experimentos foi titulado em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários e apresentou reação positiva até a diluição de 1:200, sendo a mesma estabelecida para a realização dos ensaios mencionados acima.

Foi observada marcação de resíduos de α -galactose presentes principalmente na superfície celular de micróglias por citoquímica e marcação citoplasmática das proteínas GFAP e CNPase específicas de astrócitos e oligodendrócitos por imunofluorescência, respectivamente. Além disso, foi observada marcação de antígenos virais em micróglias, astrócitos e oligodendrócitos (Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28). Não foi possível confirmar a infecção de neurônios em co-cultivos.

Foram também observadas marcações citoplasmáticas em culturas primárias de células gliais e neurônios embrionários para a enzima iNOS, apresentado maior intensidade de marcação nos cultivos do grupo controle (Figura 29 e 30).

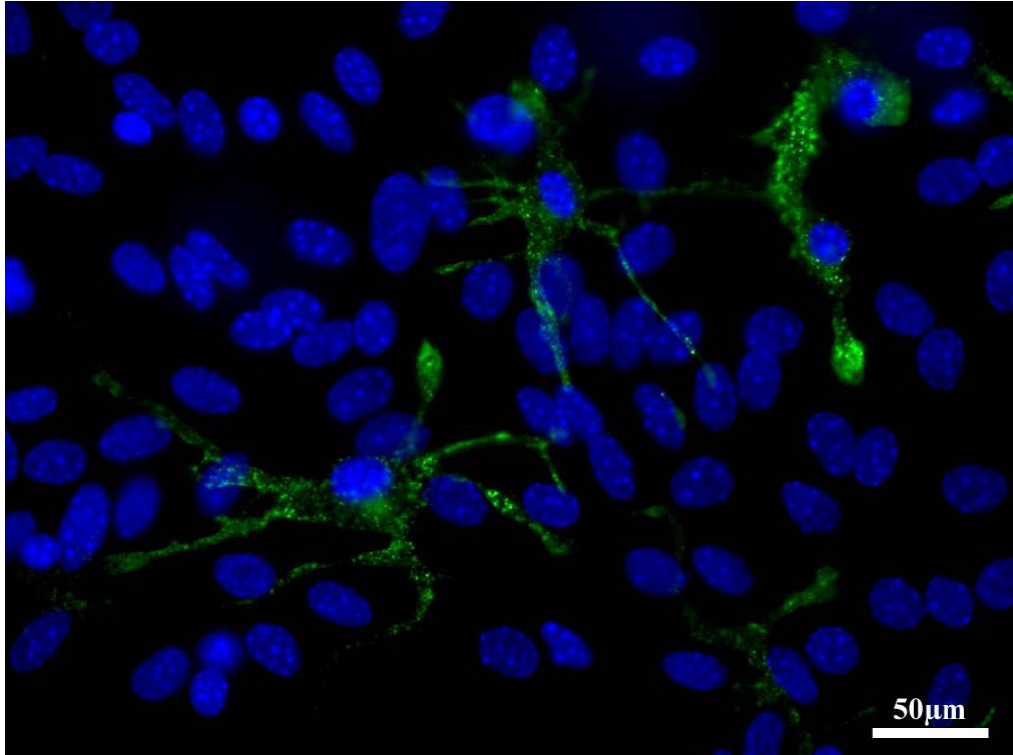


Figura 22 – Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcacão de isolectina B₄ conjugada com FITC em micróglias do grupo controle (verde), ausência de marcação para antígenos virais e coloraçã de núcleos celulares com corante azul Hoecsht 33258.

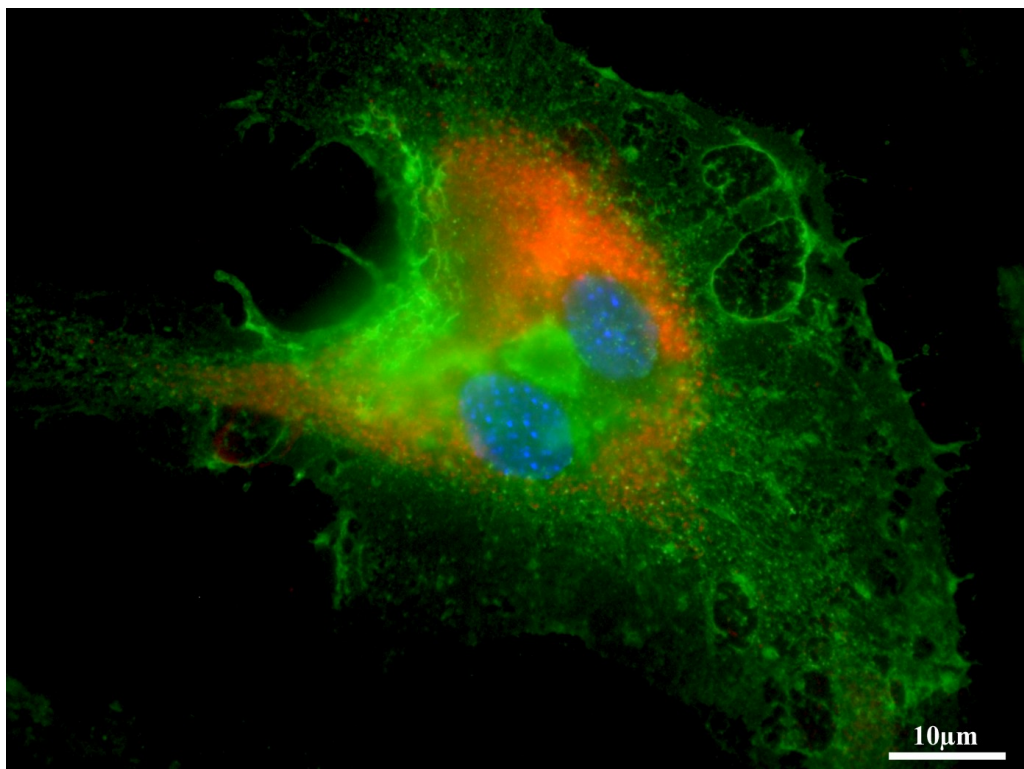


Figura 23 – Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcacão de isolectina B₄ conjugada com FITC em micróglias infectadas (verde), marcação de antígenos virais (vermelho) e coloraçã de núcleos celulares com corante azul Hoecsht 33258.

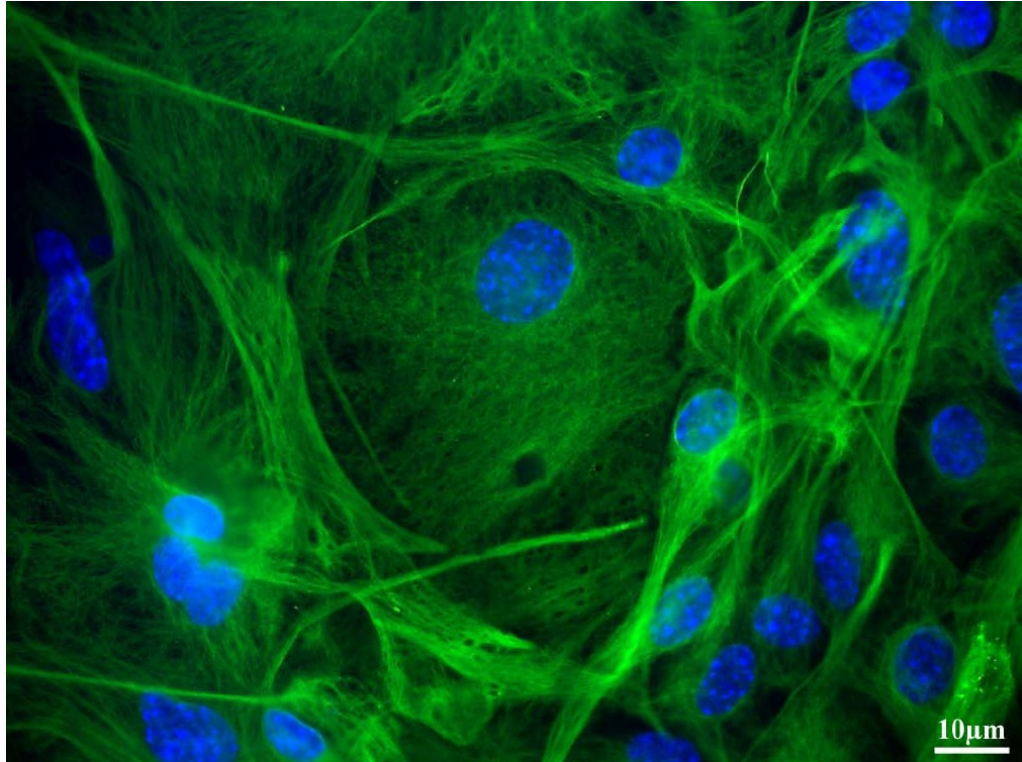


Figura 24 – Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcagem de GFAP em astrócitos do grupo controle (verde), ausência de marcação de antígenos virais e coloração de núcleos celulares com corante azul Hoechst 33258.

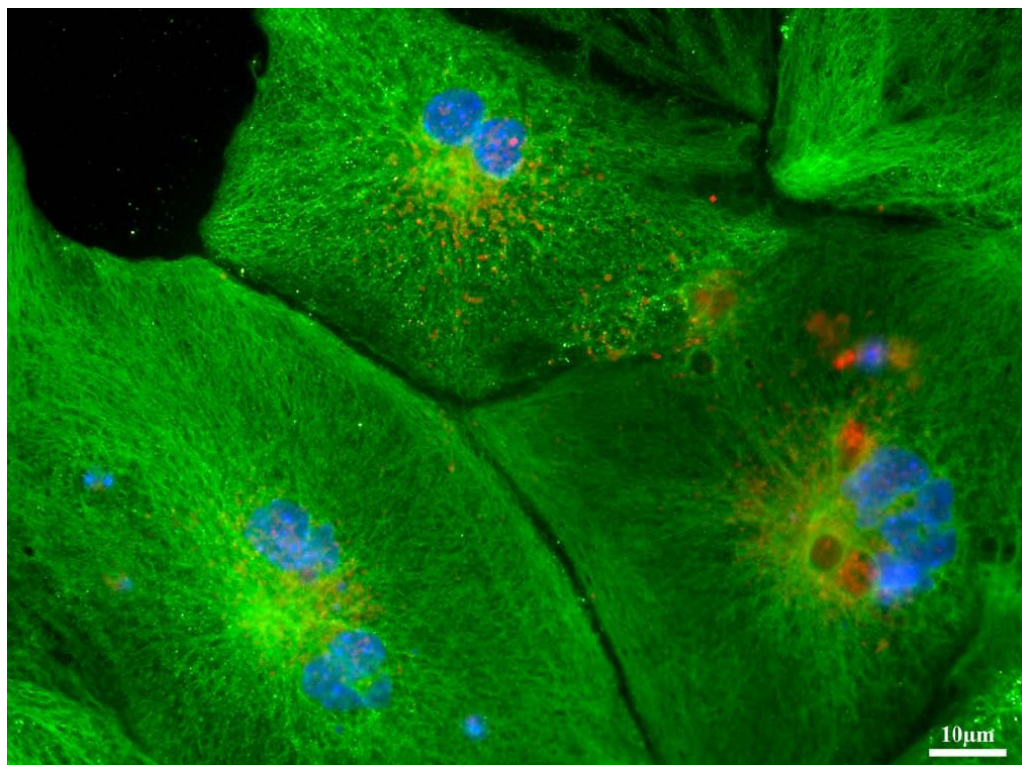


Figura 25 – Micrografia de fluorescência de co-culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcagem de GFAP em astrócitos infectados (verde), marcação de antígenos virais (vermelho) e coloração de núcleos celulares com corante azul Hoechst 33258.

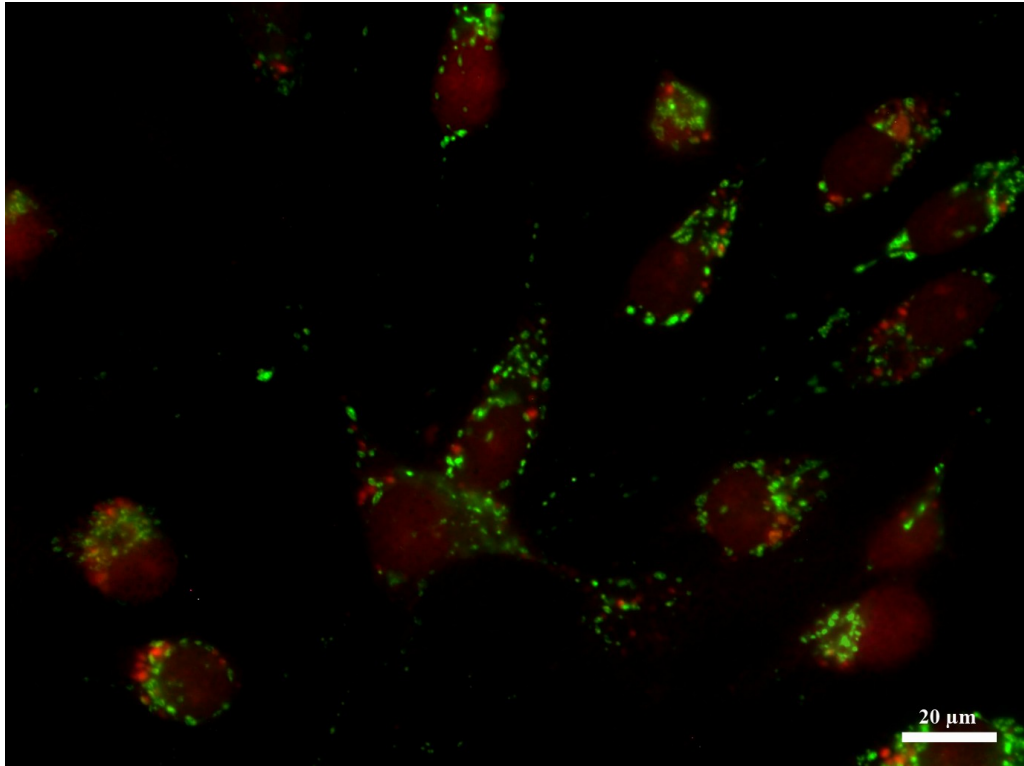


Figura 26 – Micrografia de fluorescência de culturas de oligodendrócitos no 8º d.p.i., mostrando imunomarcagem de CNPase em oligodendrócitos (verde) e coloração de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio.

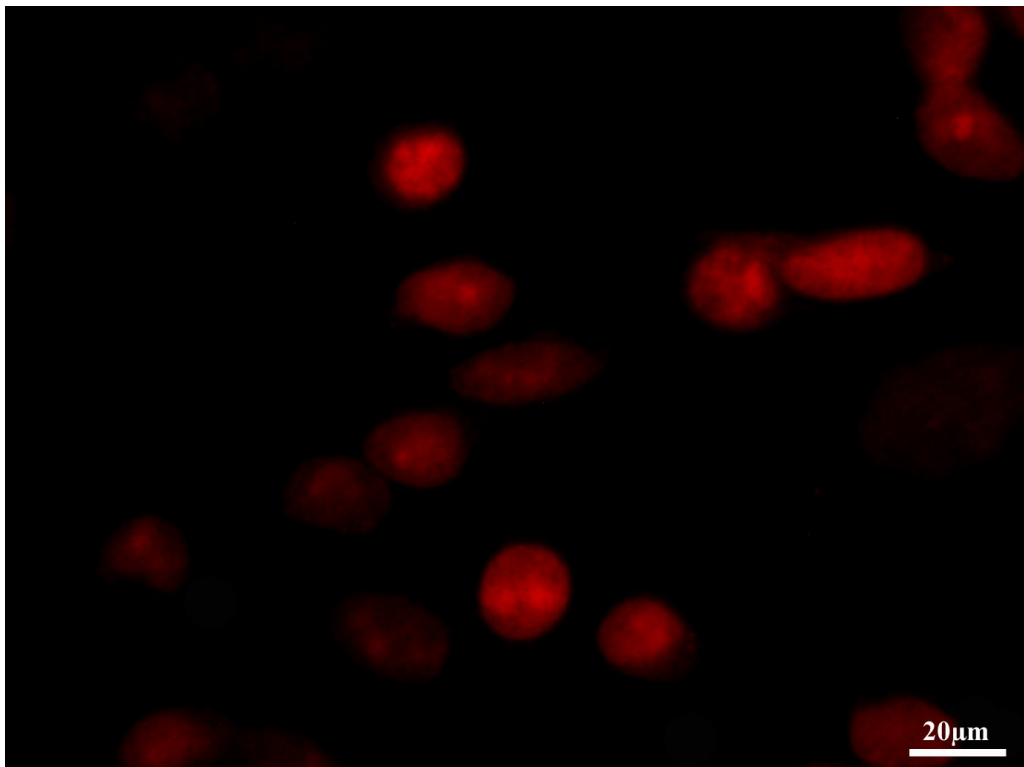


Figura 27 – Micrografia de fluorescência de culturas de oligodendrócitos no 8º d.p.i., mostrando ausência de marcação de antígenos virais em oligodendrócitos do grupo controle (verde) e coloração de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio.

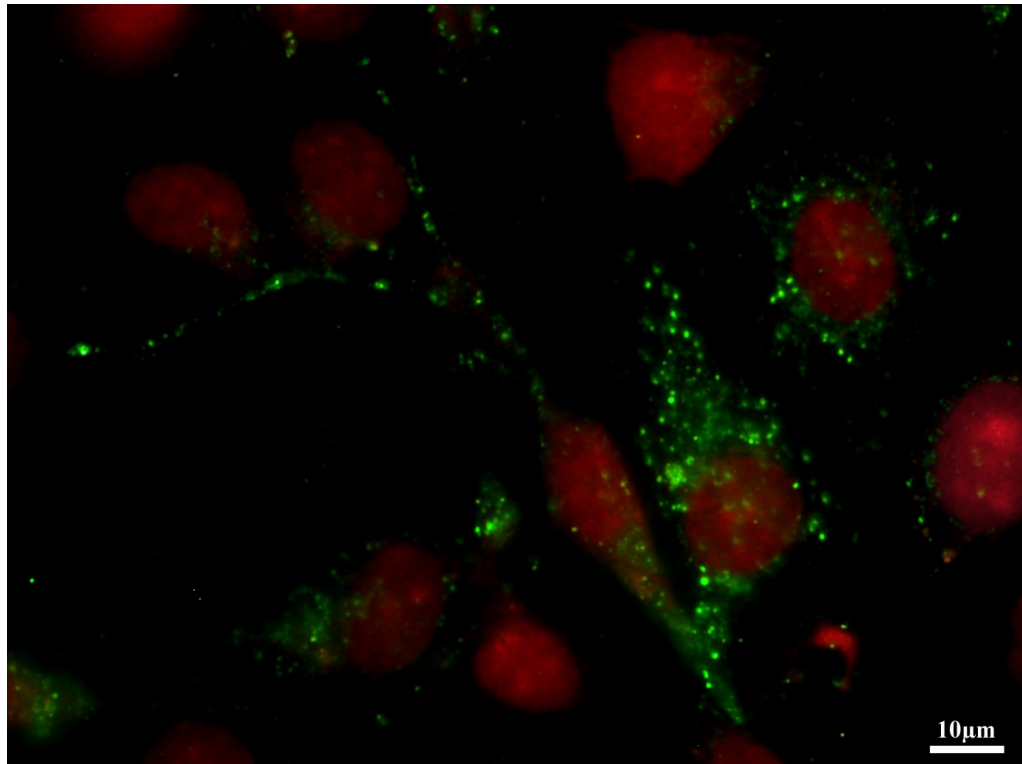


Figura 28 – Micrografia de fluorescência de culturas de oligodendrócitos no 8º d.p.i., mostrando imunomarcagem de antígenos virais em oligodendrócitos infectados (verde) e coloração de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio.

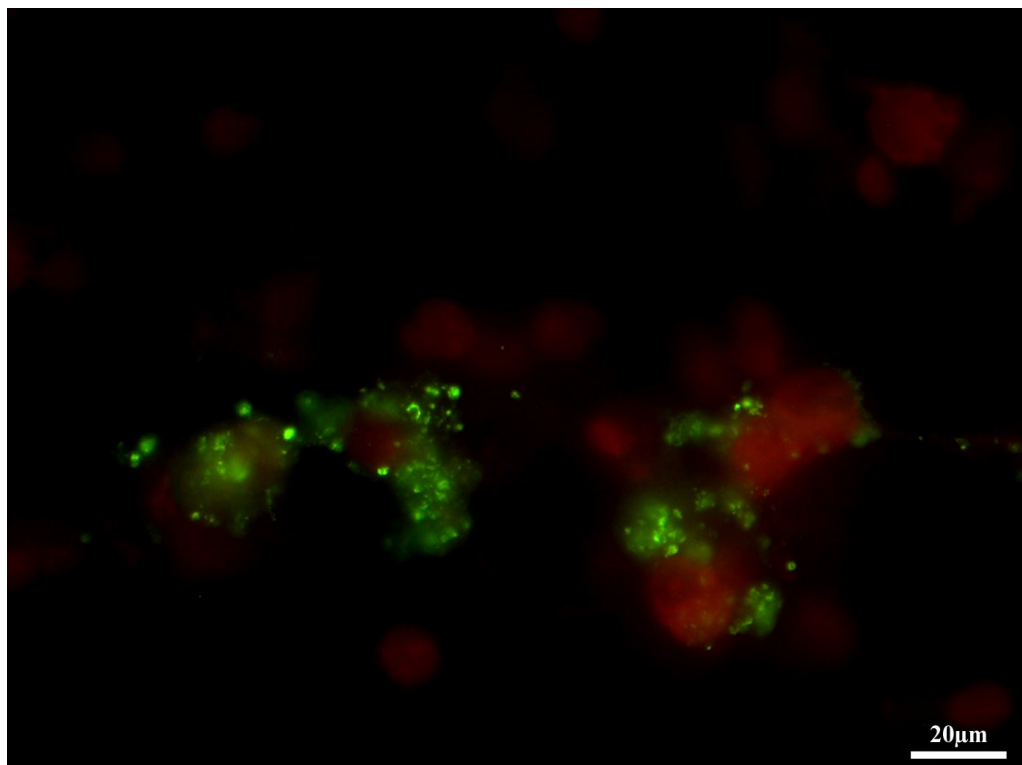


Figura 29 – Micrografia de fluorescência de culturas de células glias e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcagem de iNOS em co-cultura de células glias e neurônios embrionários não infectada (verde) e coloração de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio.

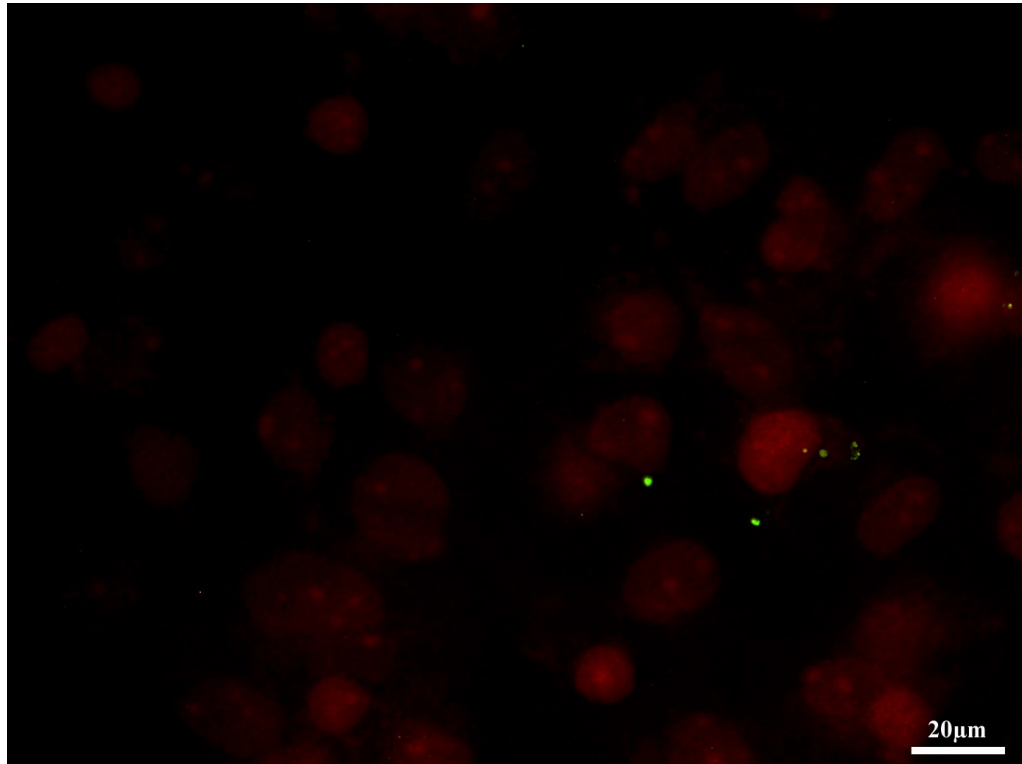


Figura 30 – Micrografia de fluorescência de culturas de células gliais e neurônios embrionários no 8º d.p.i., mostrando imunomarcagem de iNOS em co-cultura de células gliais e neurônios embrionários infectada (verde) e coloração de núcleos celulares com corante vermelho iodeto de propídio.

5.2.2 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Os resultados para a detecção de ROS obtidos a partir da quantificação da intensidade do produto de reação nas células infectadas e não-infectadas com o vírus tratadas com NBT demonstram que as culturas infectadas apresentaram um aumento significativo em relação às culturas do grupo controle (Figura 31) nos três tempos analisados, sendo que, no 4º d. p. i. , a intensidade de marcação dos cultivos infectados foi significativamente maior do que no 8º e 12º d. p. i. Entre os cultivos do grupo controle não foi observada diferença significativa (Figura 32).

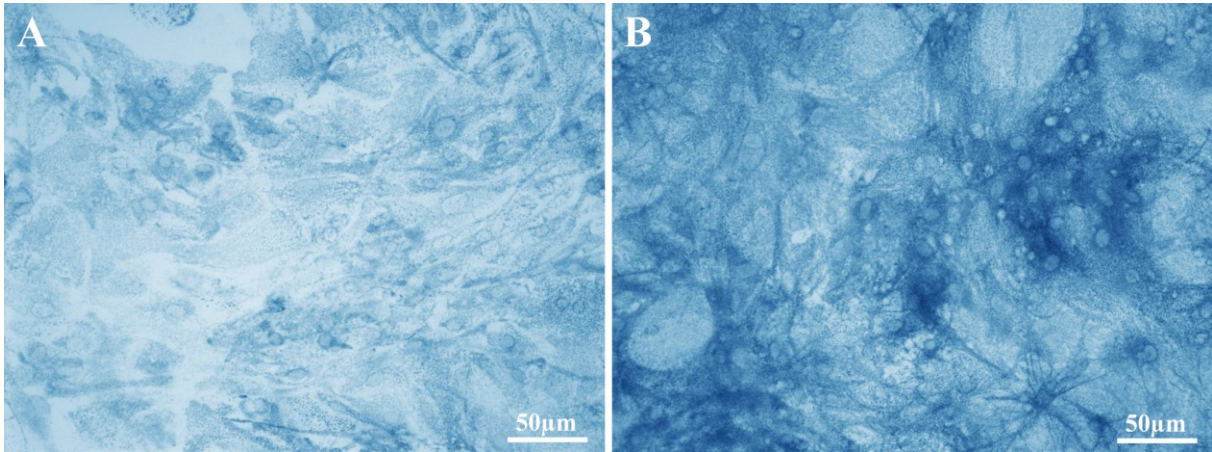


Figura 31 – Fotomicrografia de campo claro demonstrando a detecção da produção de superóxido através da reação citoquímica com NBT em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários não infectadas (A) e infectadas (B), no 4º d.p.i.

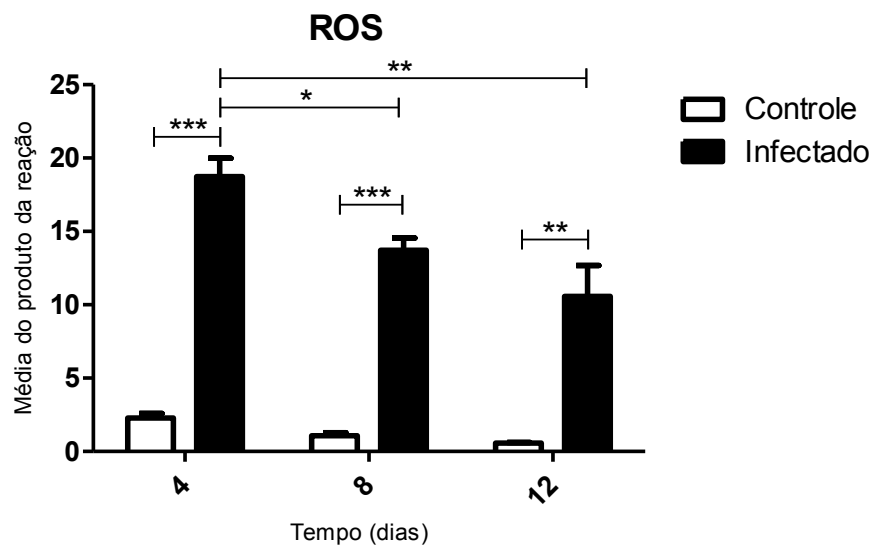


Figura 32 – Análise estatística da detecção de ROS a partir da quantificação do produto da reação em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários de camundongos albinos da linhagem BALB/c analisadas após 4, 8 e 12 dias de infecção com o vírus Juruacá. Controle = animais não infectados; Infectado = animais infectados; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com (***) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$; e (*) = $p < 0,05$.

Para melhor entender a relação entre a produção de citocinas, espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, os sinais clínicos e perda ponderal observada nos animais infectados com o vírus Juruacá, foi feito um resumo dos resultados no quadro a seguir (Quadro 1, ANEXO B).

Quadro 1 – Resumo dos resultados relacionados ao peso dos animais, sinais clínicos e à produção de citocinas, NO e ROS.

Vírus	Eventos	Tempo de sobrevivência pós-inoculação (em dias) relacionados à intensidade dos eventos		
		4°	8°	12°
Juruçá	Peso dos animais	(++)	(+++)	(+)
	Sinais clínicos	(-)	(*)	(***)
	IL-12p ₄₀	(+)	(+++)	(++)
	IL-6	(+)	(+++)	(++)
	TNF- α	(+)	(++)	(+++)
	IFN- γ	(+)	(++)	(+++)
	IL-1 β	(++)	(+++)	(+)
	IL-2	(-)	(-)	(-)
	IL-17A	(-)	(-)	(-)
	IL-4	(+++)	(++)	(+)
	IL-10	(+++)	(++)	(+)
	TGF- β 1	(-)	(-)	(-)
	NO	(+)	(++)	(++)
	ROS [#]	(+++)	(++)	(+)

(+) nível baixo, (++) nível médio, (+++) nível alto, (-) ausente, (*) poucos, (***) muitos.

(#) resultados obtidos em cultura de células

(Em verde) relação entre a diminuição do peso dos animais, a intensificação dos sinais clínicos, o aumento das citocinas pró-inflamatórias, redução das citocinas anti-inflamatórias e aumento de ROS. Observar o Anexo B.

6 DISCUSSÃO

Os estudos com o vírus Juruaçá tiveram início em 1982, quando o mesmo foi isolado em camundongos albinos suíços recém-nascidos. Nessa época, foram realizados teste sorológicos para a caracterização viral; no entanto, esses ensaios não foram suficientes para indicar uma classificação completa do vírus analisado. Araújo, em 2006, realizou novas metodologias, como microscopia eletrônica, imunomarcção, técnicas moleculares e o uso de culturas primárias de células do SNC para desenvolver um estudo experimental mais amplo a cerca do vírus Juruaçá.

A partir desses experimentos, pode-se indicar as características morfológicas; o tropismo por células do SNC, principalmente micróglia; e a classificação taxonômica provisória desse vírus na família *Picornaviridae* no gênero *Enterovirus*. Além disso, os resultados do trabalho de Araújo (2006) sugeriram que as lesões causadas nos animais infectados com o vírus Juruaçá ocorriam não somente pela ação do agente viral, mas principalmente pelo desenvolvimento de uma intensa resposta imune. Essa hipótese foi o que nos levou a desenvolver esta dissertação no intuito de verificar se a mesma teria fundamento, e se o vírus em estudo levaria os animais ao óbito pela exacerbação da resposta imune no SNC.

Para isso, foi realizada análise histológica com a finalidade de verificar se haveria diferença nas alterações anátomo-patológicas caso os animais fossem inoculados por via i.n. e a linhagem de camundongos suíços fosse substituída pela linhagem BALB/c. Foram também realizados testes histoquímicos e de imunofluorescência em culturas primárias de células do SNC e imunohistoquímico em secções de encéfalo com o intuito de confirmar a presença de antígenos virais e analisar aspectos morfológicos das micróglia que indiquem diferentes estágios de ativação celular. Além disso, foi analisada a produção de citocinas, NO e ROS para traçar um perfil da resposta imune ao vírus Juruaçá.

6.1 PATOGÊNESE

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

pela variedade de lesões e pelas altas taxas morbi-mortalidade em humanos e em animais doméstico, de importância comercial e ecológica.

A co-evolução dos agentes virais com o sistema nervoso de mamíferos demonstra um duelo constante pela sobrevivência (CHAKRABORTY et al, 2010). A maioria das infecções virais no SNC é transitória, mas algumas podem resultar em incapacidade ou morte. Diversos vírus de RNA e DNA entram no SNC por meio do transporte axonal do sistema nervoso periférico (SNP) (ABDELMAGID, 2012; DENIZOT et al, 2012) e podem induzir injúria no tecido nervoso por replicação direta e lise das células do hospedeiro, por ativação do sistema imune inato e adaptativo resultando em apoptose ou por indução de autofagia (ABDELMAGID, 2012; AMOR et al, 2010; BERTH, et al., 2009; DELEIDI; ISACSON 2012). Em outros casos, os vírus podem entrar no SNC por via hematogênica, devido às alterações nas células endoteliais dos vasos sanguíneos que permitem a passagem do vírus através da barreira hematoencefálica diretamente ou pelo interior das células infectadas que atravessam o endotélio (BERTH, et al., 2009; JOHNSON; CUNNINGHAM 2011; DELEIDI; ISACSON 2012; VERMA et al, 2009).

Citamos na sequência alguns exemplos de patógenos virais importantes por sua virulência ou pelas sequelas determinadas pela intensa resposta imune contra os mesmos estabelecida no SNC. Jurgens e colaboradores (2012) afirmaram que a maioria das pessoas consegue se recuperar completamente da infecção causada pelo vírus influenza, porém, existem casos em que esse vírus pode provocar danos significativos a curto e longo prazo no SNC, devido à neuroinflamação induzida por infecção viral periférica.

O vírus Nipah, um paramyxovirus identificado em 1999, está associado à morte por encefalite aguda em 40% a 75% dos casos registrados. Dos indivíduos que conseguem sobreviver à infecção por esse vírus, cerca de 20% apresentaram sequelas neurológicas e um pequeno número desenvolve encefalite de início tardio (FURR; MARRIOTT 2012; TYLER, 2009).

A encefalite japonesa (VEJ) é uma das arboviroses mais temidas que ocorre em humanos. Entre os flavivirus clinicamente importantes, o VEJ tem a maior taxa de mortalidade que varia de 30% a 50% e permanece como um importante problema de saúde pública em várias regiões da Ásia (FURR; MARRIOTT 2012; GUPTA; RAO 2011; SOLOMON, et al., 2003). Além de causar uma doença aguda com altas taxas de mortalidade, o VEJ pode deixar alguns sobreviventes com sequelas, como paralisia de membros inferiores e deficiência mental (GUPTA; RAO 2011).

Na família *Picornaviridae* existem quatro gêneros que contêm vírus neurotrópicos. O poliovírus, coxsackievírus, echovírus e outros membros do gênero *Enterovirus* se replicam no trato digestivo e são resistentes a pH ácido. O gênero *Cardiovirus* inclui o vírus da encefalomiocardite (VEMC) que causa paralisia flácida em camundongos e o VEMT, o qual possui diferentes cepas que provocam tanto uma doença semelhante à poliomielite em camundongos quanto uma doença desmielinizante crônica similar à esclerose múltipla. Os membros do gênero *Parechovirus* estão associados à paralisia flácida e encefalite, e o teschovírus suíno, do gênero *Teschovirus*, está relacionado ao desenvolvimento de polioencefalite em porcos (RACANIELLO, 2008).

Nesse trabalho, resolvemos usar dois parâmetros diferentes daqueles utilizados por Araújo (2006). O primeiro foi o uso da linhagem BALB/c, que foi escolhida como modelo experimental devido a algumas dificuldades com relação à imunodeteção de moléculas específicas de células do sistema imune e de citocinas anteriormente realizadas em camundongos albinos suíços; e o segundo foi a via de inoculação i. n., pois queríamos reproduzir uma infecção mais próxima do natural. Com essas duas mudanças, observamos de imediato um aumento de cinco dias no tempo de sobrevivência dos animais, que passou de sete para doze dias. O uso de uma linhagem isogênica, que em princípio deveria ser mais sensível à infecção, não demonstrou diminuição no tempo de sobrevivência dos camundongos. Isso se deve provavelmente à via de inoculação, pois, a saturação dos receptores do sistema olfatório por partículas virais limita a quantidade de vírus que entram nas células do SNC; enquanto que na inoculação i. c., além dos vírus terem acesso direto, a quantidade de partículas virais que chegam ao sistema nervoso é maior, pois não dependem de receptores de um grupo específico de células.

No estudo de Araújo (2006), as alterações anátomo-patológicas em camundongos infectados com o vírus Juruacá demonstraram no 4º d.p.i. alterações principalmente no cérebro dos animais, apresentando leve espongiose com vasos proeminentes e presença de células neuronais com aspecto apoptótico; com oito d.p.i. observou-se intenso aspecto espongiótico com comprometimento do parênquima cerebral associado à proeminência vascular, necrose e apoptose neuronal, além de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. A análise por imunohistoquímica mostrou que o padrão de imunomarcagem foi difuso, acometendo tanto corpos neuronais quanto células gliais em todas as regiões encefálicas, entretanto com nítida preferência por áreas onde predomina os achados de nódulos gliais e maior intensidade de infiltrado inflamatório.

Nossos resultados demonstraram alterações semelhantes às aquelas descritas acima, com algumas diferenças. As lesões foram menos evidentes no 4º d.p.i. e se intensificaram a partir do 8º d.p.i., finalizando no 12º d.p.i. com intensa destruição da região cortical e ativação microglial, que demonstra maior susceptibilidade das células neurais ao vírus e consequentemente maior ativação microglial nessa região do encéfalo (Figuras 14, 15, 16, 18, 19 e 20).

Infecções por enterovírus no SNC podem estar associadas à paralisia flácida aguda (SOLOMON; WILLISON 2003; SOLOMON et al., 2010), mielite disseminante aguda e mielite transversa aguda (AGIN et al., 2010). De acordo com Rhoades e colaboradores (2011), a infecção por enterovírus pode comprometer a função do plexo coróide, uma estrutura importante que está envolvida na produção do líquido cefalorraquidiano e na regulação imune; além disso, é observada a presença de células apoptóticas em ratos infectados que apresentam paralisia. Nos camundongos infectados com o vírus Juruacá, foram observadas alterações nos plexos coróides, como infiltrado leucocitário e congestão vascular e a presença de células apoptóticas foi bastante evidenciada principalmente no 12º d.p.i. (Figuras 14, 15 e 16). No entanto, não foi evidenciado grande acometimento dessa região, como descrito no estudo de Rhoades e colaboradores (2011), apesar do vírus Juruacá pertencer ao gênero *Enterovirus*.

Na infecção causada pelo vírus Theiler, os camundongos inoculados desenvolvem polioencefalite uma semana após a inoculação, caracterizada pelo envolvimento da substância cinzenta cerebral e da medula espinhal, com presença de infiltrado leucocitário mononuclear perivascular e subaracnóide constituído de linfócitos, monócitos e macrófagos. Embora haja infiltrado linfocítico de leptomeninges e córtex cerebral, a inflamação está concentrada na substância cinzenta subcortical, principalmente na região do diencéfalo (tálamo, hipotálamo e epitélamo), no hipocampo e no gânglio basal. Na medula espinhal, a inflamação está localizada no corno anterior (OLESZAK et al., 2004). Diferentemente do que foi observado no estudo de Oleszak e colaboradores (2004), nossos resultados, mostraram que o maior acometimento ocorre na região cortical, onde foi observada intensa destruição do tecido neural. Em relação às demais áreas do encéfalo, poucas alterações foram observadas, embora antígenos virais tenham sido detectados em todo o SNC, inclusive na porção anterior da medula espinhal (Figuras 16 e 17).

6.2 RESPOSTA IMUNE NO SNC

Os patógenos pertencem a um grupo muito diverso de microrganismos e a sua detecção provoca grandes mudanças no sistema imune, um complexo de processos bioquímicos que permite a destruição de microrganismos patogênicos que ameaçam a viabilidade do hospedeiro (DUNKELBERGER; SONG 2010; MACHADO et al., 2004; MELCHJORSEN et al., 2009).

De maneira sistêmica as defesas do hospedeiro contra infecções são iniciadas pelo sistema imune inato, que promove o reconhecimento dos microrganismos patogênicos, como protozoário, fungos, bactérias e vírus, por meio da ligação dos PAMPs com seus respectivos RRP, tais como os TLR, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por células efetoras, como neutrófilo, macrófagos, células NK, células gliais, e iniciando o processo de morte celular programada (KAWAI; AKIRA 2006; KIRKMAN et al., 2010; KOYAMA et al., 2008; MELCHJORSEN et al., 2009; PICKUP; FRCPAHT 2004; ZHU, Z. et al., 2007). Em sequência, como um processo interligado ao sistema imune inato, ocorre a ativação do sistema imune adaptativo, que utiliza os receptores de linfócitos T e B para reconhecer de forma mais específica os patógenos e eliminá-los, além de promover a memória imunológica de longa duração contra reinfecção (DUNKELBERGER; SONG 2010; JOHNSEN, 2009; KIRKMAN et al., 2010; WANG, J. et al., 2012).

O desenvolvimento da resposta imune antiviral envolve a organização de uma rede complexa de células das respostas imunes inata e adaptativa. O controle das infecções virais é realizado inicialmente por meio da produção e liberação dos IFNs do tipo I – IFN α e IFN β – por macrófagos e células NK, destruindo as células infectadas com o agente viral e protegendo aquelas que ainda não entraram em contato com o vírus. Também ocorre a síntese de IFN- γ – IFN do tipo II – que atua ativando macrófagos e intensificando a ação citotóxica de células NK (BIACCHESI et al., 2009; JOHNSEN, 2009; MACHADO et al., 2004; MENACHERY, 2010; ROBBINS et al., 2007). Na imunidade adaptativa contra infecções virais, ocorre a ativação de células T CD8⁺ que reconhecem os antígenos virais via MHC de classe I e exercem citotoxicidade nas células infectadas; além disso, células T CD4⁺ são ativadas e colaboram com as células B na síntese de anticorpos (KOTILLIL et al., 2003; MACHADO et al., 2004).

As interações entre o sistema imunológico e o SNC constitui a rede reguladora mais complexa e interativa em mamíferos. A resposta imune no SNC diante de uma infecção em princípio deve ser um processo rápido, rigorosamente controlado que reduza de forma eficaz a

disseminação do agente infeccioso, resultando em danos mínimos ao cérebro e prevenindo uma resposta auto-imune (CHAKRABORTY et al., 2010). A resposta imune no SNC depende da ação das células neuronais e de outras células residentes – células gliais – capazes de distinguir as células do hospedeiro das proteínas neurotóxicas, células apoptóticas e agentes patogênicos (FARINA et al., 2007; GRIFFITHS, 2009, 2010; LEVITE et al., 2008).

As células microgliais são os sensores de infecções virais no SNC e desempenham um papel fundamental na geração de resposta imune inata. Durante as fases iniciais da infecção viral, essas células atuam como importantes mediadores de processos neuroinflamatórios e representam a primeira linha de defesa antes da infiltração de linfócitos no cérebro por meio da produção e secreção de inúmeros moduladores imunes (ARAVALLI et al., 2005; FURR; MARRIOTT 2012; MESTRE et al., 2006; STELLA, 2009).

Alguns estudos mostram que o vírus HSV-1 afeta particularmente neurônios e células gliais e pode induzir uma resposta imune pela ativação de micróglias mediante a sinalização por TLR-2 e TLR-9, resultando na produção de citocinas, como TNF- α , IFN- α , IFN- β , IL-1 β e IL-6, e quimiocinas que provocam dano neuronal por estresse oxidativo e apoptose (ABDELMAGID, 2012; MARQUES et al., 2008; SCHACHTELE et al., 2010; SERGERIE et al., 2007).

Outros trabalhos mostraram que as micróglias podem ser ativadas pela presença do VEMT por meio do reconhecimento do agente viral pelos diferentes tipos TLR, promovendo o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas; além de induzir a expressão elevada de moléculas co-estimulatórias e do MHC de classe II, o que demonstram o importante papel da micróglia como célula apresentadora de antígeno (OLSON; MILLER 2004). Astrócitos e oligodendrócitos também podem auxiliar na indução da resposta imune no SNC (ALOISI et al., 1998).

Durante a infecção no SNC, o VEJ inicia uma intensa resposta inflamatória com desenvolvimento da resposta imune inata, ativação do sistema complemento e de células NK, ativação microglial e presença de infiltrado leucocitário, resultando na produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, incluindo IL-1 β e IL-18, as quais tem um papel importante na febre, choque séptico e doenças inflamatórias (DAS, et al., 2011; GUPTA; RAO 2011; KAUSHIK et al., 2012).

Assim como foi evidenciado nos trabalhos de Abdelmagid (2012), Aloisi e colaboradores (1998), Olsen e Miller (2004) e outros autores, em camundongos inoculados com o vírus Juruacá, objeto desse trabalho, foi observado que as células do SNC, especialmente micróglias, astrócitos e oligodendrócitos, são susceptíveis à infecção por esse

vírus, uma vez que foram encontrados antígenos virais no citoplasma desses tipos celulares (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 17). Em decorrência disso, as células gliais do SNC dos camundongos infectados, principalmente micróglias, estão envolvidas na resposta imune e, conseqüentemente, na intensa lesão do parênquima cerebral, uma vez que estas células foram detectadas por imunohistoquímica no córtex, apresentando morfologia compatível com o estágio mais avançado de ativação (aspecto amebóide) (Figuras 18, 19 e 20). Esses achados são semelhantes àqueles demonstrados por Gupta e Rao (2011), Marques e colaboradores (2008), Olson e Miller (2004) e Schachtele e colaboradores (2010), nos quais foram observados ativação microglial diante de uma infecção por vírus.

Nesses animais infectados foram detectadas, por ensaios imunoenzimáticos, as citocinas pró-inflamatórias IL-12p₄₀, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , em concentrações bastante elevadas (Figuras 23, 24, 25, 26 e 27), além das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, assim como foi observado nos trabalhos de Kaushik e colaboradores (2012), Olson e Miller (2004) e Sergerie e colaboradores (2007). As citocinas IL-10 e IL-4, no entanto, foram detectadas em níveis cada vez menores a medida que a infecção progride ao longo do período de sobrevivência dos camundongos (Figuras 28 e 29). Essa redução se deve muito provavelmente ao aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias por células residentes do SNC, principalmente micróglias altamente ativadas, na tentativa de eliminar o patógeno. Células dos poucos infiltrados leucocitários encontrados podem também ter contribuído para produção destes mediadores inflamatórios.

As citocinas tem um papel fundamental na indução e regulação da resposta imune contra vírus neurotrópicos. Em alguns casos a eliminação de vírus do SNC requer a migração de células do sistema imune para o local da infecção e envolve a proliferação e a diferenciação de células efêoras; todos esses processos são mediados por citocinas e quimiocinas produzidas por leucócitos, micróglias e astrócitos (MARTINEY et al., 1998; OLESZAK et al., 2004; WANG et al., 2012). As citocinas são importantes tanto para intensificar e propagar a resposta imune antiviral, quanto para regular a resposta inflamatória após a eliminação do vírus (CHANG et al., 2000; OLESZAK et al., 2004; THEIL et al., 2000).

Esses mediadores inflamatórios estão envolvidos na patogênese de diversas doenças, inclusive na infecção causada pelo VEMT, modulando tanto a fase aguda quanto a fase crônica dessa doença que são caracterizadas por diferentes aspectos patológicos (OLESZAK et al., 2004). Em decorrência da resposta imune desencadeada no SNC após invasão pelo HSV-1, tem-se cogitado que a patogênese da encefalite herpética (EH) esteja ligada ao papel

deletério que a liberação descontrolada de mediadores inflamatórios desempenha sobre o tecido cerebral (ROZENBERG et al., 2011, SAITO, 2011).

Uma dessas citocinas, a IL-12, é essencial para a geração da resposta do tipo T_H1 e é produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas, astrócitos, micróglia e linfócitos B. É negativamente regulada pela IL-4 e IL-10, que são potentes citocinas indutoras da resposta do tipo T_H2 (BUXBAUM; SCOTT 2005; TRIPATHI et al., 2007). No SNC, a expressão da citocina IL-12 tem sido associada a diversas respostas inflamatórias como EM, EAE em ratos e camundongos e na endotoxemia murina (PAGENSTECHEER et al., 2000). Durante a resposta imune inata no SNC, a IL-12 induz a produção de IFN- γ e, em retorno, o IFN- γ estimula o aumento da produção de IL-12 (feedback positivo), contribuindo para a defesa local contra agentes infecciosos (KORNELISSE et al., 1997; KOMATSU et al., 1998; REISS; KOMATSU 1998; IRELAND et al., 2005).

Juntamente com infiltrado de macrófagos, a micróglia tem sido indicada como fonte principal de IL-12 em condições inflamatórias (BECHER et al., 2000; HANISCH, 2002). *In vitro*, micróglia expressam 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 e de NO, o que sugere que IL-12 pode também promover ativação da micróglia (ALOISI, 2005).

A IL-6 é um importante ativador de processo inflamatório e dirige a transição da resposta imune inata para a adaptativa (JONES, 2005; RUBIO et al., 2011). Essa citocina pode ser induzida em astrócitos pela infecção causada por diferentes agentes virais, tais como o VSV e VEMT (RUBIO et al., 2011); e a sua presença é um indicativo da origem infecciosa de alguns doenças auto-imunes (VAN-HETEREN et al., 2008).

De acordo com Rubio e colaboradores (2011), culturas de astrócitos infectadas com VEMT – um vírus responsável por causar uma doença desmielinizante em camundongos susceptíveis é usado como modelo de esclerose múltipla – apresentam alta expressão e produção de IL-6, sugerindo que essa citocina pode estar associada à desmielinização por meio do recrutamento de células imunes para o local da infecção. Outros trabalhos relatam a habilidade de culturas primárias de micróglia e astrócitos de responder a infecções causadas por vírus de RNA e DNA produzindo mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (CHAUHAN et al., 2010; FURR; MARRIOTT 2012).

Durante a infecção causada pelo vírus Juruacá, foi observada uma produção significativamente elevada das citocinas IL-12p40 e IL-6 (Figuras 23 e 24) a partir do 8º d. p.

i. no encéfalo dos animais infectados, e mesmo sofrendo uma queda na concentração no 12º d. p. i., ainda continuaram apresentando níveis consideravelmente altos. Dados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por Aloisi (2005), Chauhan e colaboradores (2010), Hanisch (2000), Jones (2005) e Tripathi e colaboradores (2007), nos quais se observou a produção dessas citocinas por células do SNC, principalmente micróglia e astrócitos. Rubio e colaboradores afirmaram que a citocina IL-6 também é produzida na doença causada pelo VEMT e pode estar relacionada à doença desmielinizante provocada por esse agente viral; de acordo com esse dado, a produção de IL-6 durante a infecção causada pelo vírus Juruuaçu pode ser um indicativo do desenvolvimento de uma possível doença desmielinizante nos camundongos infectados.

A citocina TNF- α é secretada por células NK, macrófagos e células T ativadas e é capaz de induzir a lise celular e apoptose, porém, pode levar a produção de mediadores inflamatórios e proteínas antiapoptóticas; esses dois mecanismos de ação do TNF- α dependem do tipo de receptor (TNF-RI e TNF-II) que está presente na maioria das células no local da infecção (KIRKMAN et al., 2010, KRISHNASWAMY et al., 2006). Além disso, essa citocina atua como um indutor na síntese de IL-6 durante o processo inflamatório induzido por infecções virais (BEVENISTE et al., 1990).

O TNF- α pode ter efeito citotóxico em diversos tipos celulares, como ocorre em EAE causando danos em oligodendrócitos. Inoue e colaboradores (1996) demonstraram a relação entre o grau de desmielinização e o aumento da expressão de TNF- α no cérebro de camundongos infectados com o vírus Theiler. Begolka e colaboradores (1998), por sua vez, demonstraram que, durante a infecção induzida pela cepa BeAn do VEMT em camundongos SJL, os níveis de transcrição de TNF- α e IFN- γ estão relacionados com a manifestação mais intensa dos sinais clínicos.

O IFN- γ é uma citocina de natureza pleiotrópica que apresenta atividade antiviral (DINARELLO, 2006). Pode ser produzido por células T, células NK (LAMMAS et al., 2000; MENACHERY, 2010; VIDY et al., 2005; WANG et al., 2012), macrófagos e células apresentadoras de antígenos em resposta a infecções virais (ELLERMAN-ERIKSEN, 2005; LAMMAS et al., 2000; WANG et al., 2012). O IFN- γ é responsável por ativar micróglia e astrócitos, que por sua vez produzem TNF- α , IL-1 e IL-6, bem como NO e ROS (CORRADIN et al., 1993; LAMMAS et al., 2000; LEE et al., 1993; OLESZAK et al., 2004). O IFN- γ também pode provocar retração dendrítica em neurônios expostos a altas concentrações dessa citocina (CHAKRABORTY et al., 2010).

O papel do IFN- γ em proteger o SNC e eliminar o agente viral tem sido descrito em muitos casos de encefalites causadas por vírus neurotrópicos (BURDEINICK-KERR; GRIFFIN 2005; CHAKRABORTY et al., 2010). Essa citocina protege os neurônios da encefalite provocada pelo HIV-1 no SNC por meio da inibição de apoptose induzida por esse vírus (CHACRABORTY et al., 2010). Byrnes e colaboradores (1989) afirmaram que o IFN- γ pode intensificar os processos inflamatórios agudos, provocando inclusive choque endotóxico; por isso, não é surpreendente que a produção dessa citocina é mantida sob controle em condições normais.

A resposta imune gerada no SNC durante uma infecção pelo vírus Sindbis (VSIN) foi caracterizada pela produção de diversos fatores inflamatórios responsáveis por eliminar o agente viral, tais como IFNs, TNF- α , IL-1, IL-6, quimiocinas que induzem a ativação glial, expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e migração celular (BURDEINICK-KERR et al., 2007; GRIFFIN; METCALF 2011).

Nos camundongos infectados com o vírus Juruuaçá, as citocinas TNF- α e IFN- γ foram produzidas de forma gradual ao longo da infecção, alcançando níveis extremamente elevados ao final do 12º d. p. i. (Figuras 25 e 26). Assim como nos animais inoculados com o vírus em estudo, Begolka e colaboradores (1998), Chacraborty e colaboradores (2010) e Griffin e Metcalf (2011) também demonstraram a produção elevada de TNF- α e IFN- γ durante infecções causadas por diversos agentes virais.

A IL-1 é uma citocina multifuncional que pode ser produzida por macrófagos e células gliais, sendo responsável por co-estimular a resposta de células T e B e induzir a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas para recrutar leucócitos periféricos e gerar neuroinflamação (CARLOS; HARLAN 1994; OLESZAK et al., 2004; WANG et al., 2012). No SNC, a IL-1 β pode ser prejudicial para a saúde das células neuronais e a falta de controle na regulação da secreção dessa citocina resulta em danos nos neurônios levando à sequelas neurológicas (DAS et al., 2008), como ocorre na infecção causada pelo VEJ (KAUSHIK et al., 2012).

Além disso, a infecção causada pelo HIV-1 pode levar por si só à ativação de células polimorfonucleares e à secreção de diversos fatores neurotóxicos, como por exemplo, das citocinas TNF- α e IL-1 β que, no contexto da infecção causada por esse agente viral, são consideradas tóxicas ao SNC (BRABERS; NOTTET 2006; KRAFT-TERRY et al., 2009), e ainda induzem a secreção de IL-8 por astrócitos, uma citocina envolvida na quimiotaxia de neutrófilos para o local da infecção (SAAS et al., 2002). Algumas evidências mostram que a

IL-1 β também pode ser sintetizada no SNC em resposta a infecção causada pelo EV71 (WANG et al., 2012).

De acordo com Brabers e Nottet (2006), Kaushik e colaboradores (2012), Kraft-Terry e colaboradores (2009) e Wang (2012), a secreção da citocina IL-1 β pode ser prejudicial ao SNC se não for devidamente controlada. Em camundongos no 8º dia de infecção com o vírus Juruacá, os níveis da citocina IL-1 β são significativamente elevados, apresentando uma drástica redução no 12º d. p. i., devido a esse aumento, esta citocina pode estar associada à destruição das células do SNC durante a infecção causada pelo vírus em estudo.

A IL-10 é uma importante citocina imunoregulatória produzida por macrófagos, monócitos, linfócitos T e B (OLESZAK et al 2004; WANG et al., 2012). Inibe um amplo espectro de respostas imunes celulares e está associada a diversas doenças mediadas pela imunidade. Com isso, a ação inibidora desta citocina favorece a infecção persistente de alguns agentes virais, por evitar o seu reconhecimento pelo sistema imune inato (EJRNAES et al.,2006; ROUSE; HOROHOV 1986).

A IL-10 pode modular condições neuropatológicas agudas e crônicas bastante severas (WANG et al., 2012) e a importância da sua produção tem sido amplamente estudada em doenças autoimunes (MACKINSTRY et al., 2009). Estudos com uma variante não virulenta da cepa BeAn do vírus Theiler demonstraram que a infecção apresenta uma expressão preferencial da citocina IL-10 sobre a IL-2 por células dendríticas e macrófagos, indicando que as propriedades imunossupressoras da IL-10 podem inibir a ativação das células T auto-reativas (OLESZAK et al, 2004; PALMA et al., 2002). Begolka e colaboradores (1998) demonstraram que durante a infecção induzida pela cepa BeAn do VEMT em camundongos SJL a transcrição das citocinas IL-4 e IL-10 foi observada em todo o curso da doença; enquanto que na infecção provocada pela cepa DA do VEMT as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-10 foram expressas em níveis mais baixos na fase aguda da doença (CHANG et al., 2000; OLESZAK et al., 2004). Também foi verificada a produção de IL-10 em camundongos selvagens infectados com o vírus influenza, auxiliando no controle da resposta inflamatória (MACKINSTRY et al., 2009).

A IL-4 também é uma citocina imune regulatória capaz de suprimir o processo inflamatório (KOPF et al., 1993; PONOMAREV et al., 2007) e, juntamente com a IL-10 e o TGF- β 1, torna-se um potente inibidor da ativação de macrófagos e monócitos (OLESZAK et al., 2004). A IL-4 prejudica a atividade de linfócito T induzida por IL-2 e inibe a síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-12, por meio de mecanismos dependentes de STAT6 (LEVINGS; SCHRADER 1999).

Sua produção por células microgliais e astrócitos é muito importante para regular o processo inflamatório no SNC. Acredita-se que na EAE, as micróglia produzam IL-4 em resposta a sinais inflamatórios a partir de oligodendrócitos em processo de morte celular ou de astrócitos ativados, resultando no aumento da síntese dessa citocina anti-inflamatória que tem o potencial de regular as citocinas pró-inflamatórias produzidas por astrócitos (PONOMAREV et al., 2007). Oleszak e colaboradores (2004) encontraram altos níveis de IL-4 na medula espinhal de camundongos infectados com o VEMT e que já tinham desenvolvido a doença desmielinizante crônica tardia. A IL-4 produzida durante essa fase da doença pode contribuir para a desativação de macrófagos; no entanto, por inibir a geração de LTC antivirais, essa citocina acaba contribuindo para a perpetuação da permanência do VEMT (OLESZAK et al., 2004).

Alguns estudos, como os de Ejrnaes e colaboradores (2006), MacKinstry e colaboradores (2009), Ponomarev e colaboradores (2007) e Wang (2012), mostraram a importância da produção das citocinas IL-10 e IL-4 para o controle do processo inflamatório durante infecções virais, por exemplo, por meio da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, a ação inibidora dessas citocinas observada nos trabalhos de Oleszak e colaboradores (2004) e Rouse e Horohov (1986) podem favorecer a infecção persistente de agentes virais. Já que a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 foi significativamente elevada nos tempos iniciais e diminuiu ao longo do tempo de sobrevivência dos camundongos infectados com o vírus Juruacá (Figuras 28 e 29), acredita-se que a produção inicial dessas citocinas tenha favorecido a disseminação do vírus em estudo, que por sua vez pode ter inibido a ação das mesmas, contribuindo dessa forma para a exacerbação da resposta imune.

O NO é uma molécula multifuncional que desempenha um papel importante nas respostas imunes (OLESZAK et al., 2004). Está envolvido em vários processos fisiológicos e patológicos; em baixas concentrações, atua na potenciação e plasticidade sináptica, modulação de neurotransmissores e vasodilatação, enquanto que em concentrações mais altas, participa dos processos de desmielinização e em outras doenças neurodegenerativas (KIM; VELLIS 2005; SAHA; PAHAN 2006). É o principal mediador citotóxico de células efetoras imunes e é a molécula reguladora mais importante do sistema imune. No entanto, o NO é potencialmente tóxico e sua toxicidade é evidenciada em situações de estresse oxidativo, de produção de reativos intermediários de oxigênio e na deficiência do sistema antioxidante (DUSSE et al., 2003; KIM; VELLIS 2005). Sua produção em grande quantidade foi verificada em doenças neurotóxicas e neurodegenerativas, tais como esclerose múltipla,

encefalomielite autoimune experimental, isquemia cerebral, meningite e rompimento da barreira hematoencefálica durante hipertensão aguda (KOMATSU et al., 1999).

O NO também regula as células do sistema imune por meio do controle do nível de apoptose e de células T auto-reativas; do bloqueio da função de células apresentadoras de antígenos; da regulação da expressão de moléculas de adesão; e da imunossupressão da resposta imune através da inibição da proliferação de células T (KOLB; KOLB-BACHOFEN 1998).

No SNC, está claro que o NO apresenta dupla função, que dependem do momento e do local de produção do NO para se desenvolverem no cérebro. Na EAE, o bloqueio da produção de NO por meio de inibidores de iNOS tem mostrado tanto efeitos protetores quanto deletérios para o SNC (BOGDAN, 1998; PONOMAREV et al., 2007). Algumas evidências mostram que a resposta imune desenvolvida no SNC mediante a presença de agentes virais pode provocar destruição de células neuronais por meio da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio por células gliais, do aumento dos níveis do neurotransmissor excitotóxico glutamato e da síntese de citocinas por linfócitos ativados (GRIFFIN, 2011; TILLEUX; HERMANS 2007). Bi e colaboradores (1995), por sua vez, demonstraram que micróglia e astrócitos respondem à infecção causada pelo VSV aumentando o número de células gliais, produzindo a enzima iNOS e elevando a expressão de moléculas de MHC-II, o que pode resultar em danos no SNC.

Muitas citocinas pró-inflamatórias associadas com o sistema imune inato induzem a expressão de iNOS em micróglia e astrócitos. O IFN- γ sozinho é suficiente para realizar a indução dessa enzima em micróglia primárias de ratos e camundongos (SAHA; PAHAN 2006). A citocina IFN- γ tem capacidade de controlar a proliferação de microrganismo em neurônios por meio da produção de NO, além de afetar a fisiologia do sistema nervoso para facilitar o controle de doenças infecciosas (ROTTENBERG; KRISTENSSON 2002). Segundo Komatsu et al. (1999), a produção de IFN- γ estimulada pela presença da citocina IL-12 está envolvida na indução da iNOS e consequente aumento da produção de NO por micróglia. Suzuki et al. (2005), Kawanokuchi et al. (2006) e Yang e Suzuki (2007) demonstraram que micróglia podem produzir IFN- γ e que provavelmente essas células também possam responder a infecção viral com a produção sequencial de IL-12, IFN- γ e NO.

Na infecção persistente em micróglia, o VEMT induz uma ativação potente da resposta imune inata. Essa ativação tem implicação importante para resposta inflamatória inicial, com consequente desenvolvimento da resposta imune adaptativa, e para o mecanismo efetor que envolve a destruição da bainha de mielina em doenças desmielinizantes induzidas

pelo VEMT. As micróglias ativadas podem induzir a ativação de células T e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias derivadas de células T_h1 , como IL-12 e IFN- γ , que podem levar ao influxo e ativação de monócitos e macrófagos periféricos. As micróglias também induzem a secreção de moléculas efetoras – TNF- α e NO – que causam a destruição da bainha de mielina, resultando na apresentação de epítomos endógenos de mielina e na ativação de células T específicas para antígenos da mielina que perpetuam o processo inflamatório crônico (OLSON et al., 2001).

Diferentemente do que foi evidenciado nos trabalhos acima citados, nossos resultados demonstraram uma redução expressiva de iNOS em co-culturas de células gliais e neurônios embrionários infectados (Figuras 12 e 13). Isto provavelmente pode explicar a diminuição significativa da produção de NO no encéfalo dos camundongos infectados (Figura 30), quando comparado com os do grupo controle, o que pode ser sugestivo de uma possível inibição da produção dessa enzima nos animais do grupo infectado, induzida pelo vírus Juruaá.

O aumento significativo de NO ao longo do tempo no encéfalo de animais do grupo controle (Figura 30) pode ser explicado pelo fato dessa molécula estar relacionada a uma variedade de aspectos do desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo neurogênese, motilidade axonal e no rearranjo sináptico dependentes de atividades durante o desenvolvimento pós-natal (SEIDEL; BICKER 2000). De acordo com Sánchez-Islas e León-Olea (2004), o NO é abundante nas terminações sinápticas e participa da regulação da liberação de neurotransmissores, da plasticidade sináptica, da proliferação neuronal e da fusão das vesículas sinápticas. Além disso, o NO atua como um regulador negativo da proliferação de precursores granulares e promove a sobrevivência e diferenciação desses tipos de neurônios. O NO também é um dos principais reguladores da plasticidade bidirecional em fibras de Purkinje, desempenhando um papel fundamental na aprendizagem cerebelar relacionada ao controle motor (CONTESTABILE, 2012).

ROS são moléculas produzidas pela NOX, responsável pelo “burst” oxidativo que é desencadeado pelo reconhecimento de agentes patogênicos e resultada na liberação de ânions superóxido no interior das células. ROS são consideradas como subprodutos nocivos do metabolismo do oxigênio intrínseco ou de respostas celulares a estímulos perigosos. Em células apresentadoras de antígenos, como as micróglias, concentrações elevadas de ROS produzidas no interior dos vacúolos fagocíticos, onde ocorre o processamento dos antígenos de agentes patogênicos, pode danificar gravemente os tecidos circundantes por meio da

interação com um grande número de moléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (ANO et al., 2012; TACKE et al., 2012).

No entanto, em concentrações relativamente baixas, ROS servem como segundos mensageiros para diversos processos fisiológicos no interior das células, por exemplo, as células T podem liberar peróxido de hidrogênio ou ânions superóxido em resposta a estímulos mitogênicos. A relação entre infecção viral do SNC e injúria de células neuronais mediada pela produção de ROS vem sendo amplamente estudada (ANO et al., 2012; MATSUE et al., 2003).

O estresse oxidativo está relacionado à patogênese de várias perturbações, como cânceros, envelhecimento, diabetes, aterosclerose, inflamação crônica, infecções por agentes virais, lesão por isquemia, entre outros (ANO et al., 2012; MATSUE et al., 2003). As citocinas, como IL-1 β e TNF- α , que são produzidas em uma variedade de patologias do SNC, são um dos mediadores inflamatórios envolvidos na produção de ROS por células microgliais (MANDER et al., 2006). Na doença de Alzheimer, as lesões neuronais podem ser resultantes dos efeitos neurotóxicos da produção de ROS em resposta à produção de citocinas ou outros estímulos inflamatórios, sendo as micróglia as principais células do SNC responsáveis pela síntese desse mediador inflamatório (MURPHY et al., 1998).

De acordo com Hristov e colaboradores em (2010), a infecção causada pelo parvovírus H-1PV em células HEK-293 e HeLa induz a produção intracelular de ROS, que consequentemente leva a danos na dupla fita do DNA celular, à parada da divisão celular em G2 e à morte celular por apoptose.

As micróglia podem ser ativadas por infecções virais e liberar grandes quantidades de citocinas e ROS, que induzem a apoptose neuronal. Recentemente reportou-se que as micróglia foram ativadas pela infecção com o VEMC, resultando na produção elevada de ROS via NOX, que é tóxica para as células do SNC em encéfalos de ratos (ANO et al., 2010, 2012).

Em culturas primárias de células do SNC infectadas com o vírus Juruacá foi observado que os níveis de ROS foram significativamente elevados desde o 4º d.p.i. (Figuras 31 e 32), o que pode estar associado à intensa destruição das células neuronais e gliais nos camundongos infectados; já que esse mediador inflamatório é responsável por causar danos ao SNC em casos de doenças infecciosas ou neurodegenerativas, como descrito nos estudos realizados por Ano e colaboradores (2012), Hristov e colaboradores (2011), Murphy e colaboradores (1998) e Tacke e colaboradores (2012)

Foi observado também que os camundongos do grupo infectado demonstraram perda ponderal ao longo da infecção quando comparado com os animais do grupo controle. A partir do 9º d.p.i, um dia após a explosão da produção de citocinas pró-inflamatórias, o grupo de animais infectados passou a perder peso em relação aos períodos anteriores, caracterizando um processo de caquexia que se prolongou até o 12º d.p.i, quando os animais foram a óbito. Essa perda de peso também foi evidenciada no estudo de Yrmiya e colaboradores (2000), no qual mostraram que a ativação de mediadores do sistema imune induz uma doença semelhante à depressão, em que um dos sintomas característico é a perda de massa corporal.

Além disso, na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), é bastante evidenciada a perda de massa corporal, associada ao aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β na circulação sanguínea dos pacientes (DI FRANCIA et al., 1994; EAGAN et al., 2012). Kotler (2000) e Morley e colaboradores (2006) afirmaram que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α , IFN- γ e IL-2 é provavelmente a causa mais comum de caquexia observada em pacientes com doença aguda. As citocinas, que são importantes na iniciação da resposta de fase aguda, também estão relacionadas com a gênese da Síndrome da caquexia cancerosa (CC); a IL-6 pode desempenhar um papel significativo na perda de massa muscular em alguns tumores animais, por meio das vias lisossomais e não lisossomais. Foi demonstrado ainda que o TNF- α apresenta efeito catabólico direto sobre os músculos esqueléticos e no tecido adiposo, produzindo atrofia muscular por meio da redução da síntese e aumento da degradação de proteínas (KUMAR et al., 2010).

Citocinas pró-inflamatórias induzidas por infecções virais são um dos principais fatores responsáveis pelas mudanças na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e consequentemente recrutamento de leucócitos para o local da infecção (BALAKRISHNAN; MISHRA 2008; KIRKMAN et al., 2010).

Células T CD8⁺ desempenham um papel importante na proteção contra infecções causadas por vírus, bactérias intracelulares, protozoários e também contra agentes tumorais e na rejeição em transplantes, produzindo rapidamente vários tipos de citocinas e provocando a morte citolítica das células-alvo (EKKENS, et al., 2007; GUIDOTT; CHISARI 2001). Porém, em alguns modelos de doenças causadas por vírus foi afirmado que as células T também podem provocar patologia no local da infecção (BINDER et al., 2003; DESHPANDE et al., 2001).

Chevelier e colaboradores (2011) mostraram a presença de linfócitos T CD8⁺ nas proximidades das lesões de células neuronais infectadas com o vírus da doença de Borna (VDB) e estabeleceram o papel central desses linfócitos na encefalite induzida pelo VDB e na

destruição neuronal. Nesse estudo, foi observado que neurônios podem expressar moléculas de MHC de classe I e apresentar antígenos virais para células T CD8⁺, responsáveis pela destruição neuronal, desencadeando a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 que participam do processo inflamatório. Haring e colaboradores (2002), por sua vez, mostraram que células T CD8⁺ não específicas para vírus foram capazes de provocar lesões no SNC, podendo estar envolvidas no desenvolvimento de doenças auto-imunes.

Em nossos resultados foram observados infiltrados leucocitários principalmente nos dias mais tardios da infecção, devido provavelmente à intensa produção de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias que são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos. No entanto, verificou-se que a quantidade de infiltrado inflamatório foi bastante inferior nos camundongos infectados com o vírus Juruaçá, se comparado ao número de células leucocitárias encontradas em infecções causadas por outros agentes virais. Devido à importância da ação dos leucócitos durante um processo infeccioso, novos experimentos serão necessários para identificar os tipos de leucócitos presentes no SNC dos camundongos infectados.

Células gliais, como os astrócitos, também contribuem para os efeitos citotóxicos no SNC diante de uma infecção. Essas células estão associadas à indução de excitotoxicidade mediada por glutamato durante a infecção viral por meio da ação de citocinas pró-inflamatórias sobre a regulação da homeostase desse fator, o que pode resultar em níveis excessivos de glutamato extracelular ao redor dos neurônios e células gliais, causando estresse oxidativo nas neurogliais, neuroexcitabilidade e dano neuronal (ERDMANN et al., 2006; KIRKMAN et al., 2010; KRAFT-TERRY et al., 2009). Além da ação do glutamato, a ativação do sistema complemento é um fator importante em doenças inflamatórias, neurodegenerativas e cerebrovasculares. Os componentes do sistema complemento são sintetizados no cérebro por neurônio e principalmente por astrócitos, e a expressão dos mesmos é aumentada durante um processo infeccioso, podendo desencadear efeitos deletérios no SNC dependendo do contexto patofisiológico (CHEN; REISS 2002; GASQUE et al., 1996; RUS; NICULESCU 2001; VAN BEEK et al., 2003). Estas vias também podem estar associadas à destruição maciça de células do SNC dos camundongos infectados com o vírus Juruaçá, o que poderá ser avaliado futuramente.

De acordo com Aravalli et al., 2005, TLR-2 desempenha um papel importante na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CCL2, CCL7, CCL8, CCL9, CXCL1, CXCL4 e CXCL5, durante a infecção com HSV em murinos. Devido o vírus Juruaçá ter induzido a produção das citocinas pró-inflamatórias

citadas acima, além de outras, como IFN- γ , provavelmente esse vírus também pode ter deflagrado o mecanismo de indução dessas citocinas por meio do reconhecimento por TLR, o que poderá também ser avaliado posteriormente.

Em resumo, na infecção provocada pelo vírus Juruaçá, várias citocinas pró-inflamatórias foram encontradas em concentrações significativamente elevadas a partir do 8º d.p.i. e as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 demonstraram redução ao longo do período de infecção. Provavelmente, no início da infecção, a proliferação do vírus Juruaçá foi favorecida pela expressão mais elevada destas citocinas anti-inflamatórias, entretanto, a ação inibidora das mesmas diminuiu ao longo do tempo e o aumento da quantidade de antígenos virais resultou na indução exacerbada da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) dando início a uma ação devastadora sobre as células do SNC e a maior manifestação dos sinais clínicos. Essa destruição celular pode ter sido ocasionada tanto pela atuação direta das citocinas sobre as células infectadas, como pela indução da ativação das células gliais, principalmente micróglia, que passam a produzir espécies reativas de nitrogênio e oxigênio na tentativa de controlar o processo infeccioso, mas que podem, por outro lado, ter exercido uma ação citotóxica sobre as células do SNC. Além disso, a presença do infiltrado leucocitário pode ter contribuído nesse processo de degeneração celular.

Diante do exposto, fica evidente que os nossos resultados contribuíram para a comprovação da hipótese levantada por Araújo (2006), de que o vírus Juruaçá é responsável por uma doença de cunho inflamatório que leva a óbito 100% de camundongos neonatos infectados experimentalmente com este agente.

7 CONCLUSÃO

- ❖ Camundongos albinos da linhagem BALB/c recém nascidos são sensíveis à replicação do vírus Juruacá, quando inoculados pela via i.n.;
- ❖ Astrócitos, micróglia e oligodendrócitos em cultivos primários de camundongos albinos da linhagem BALB/c também são susceptíveis à infecção pelo vírus Juruacá;
- ❖ O vírus Juruacá apresentou tropismo por neurônios e células gliais em camundongos recém nascidos da linhagem BALB/c;
- ❖ Alterações anatomo-patológicas indicam o córtex cerebral de camundongos recém nascidos como principal alvo da infecção pelo vírus Juruacá;
- ❖ Micróglia apresentou aspecto morfológico amebóide, característico de fenótipo ativado, em encéfalos de camundongos neonatos, principalmente na região cortical;
- ❖ Camundongos inoculados com o vírus Juruacá apresentaram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias nos tempos tardios da infecção;
- ❖ Camundongos inoculados com o vírus Juruacá apresentaram redução nos níveis de citocinas anti-inflamatórias ao longo da infecção;
- ❖ A produção de NO foi reduzida, provavelmente, devido à inibição da enzima iNOS induzida pelo vírus Juruacá;
- ❖ A infecção pelo vírus Juruacá provocou grande aumento da produção de ROS ao longo da infecção;
- ❖ O vírus Juruacá é responsável pela morte de 100% dos camundongos neonatos devido à exacerbação da resposta imune no SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABDELMAGID, N. O. **Genetic regulation of neuroinflammation after infection and injury**. 2012. 52 f. Tese. Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet from Stockholm.
- AGIN, H.; APA, H.; UNALP, A.; KAYSERILI, E. Acute disseminated encephalomyelitis associated with enteroviral infection. **Neurosciences (Riyadh)**, v. 15, p. 46-48, 2010.
- ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse . **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 2, p. 76-87, 2011.
- ALOISI, F.; RIA, F.; PENNA, G.; ADORINI, L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 activation. **J. Immunol.**, v. 160, p. 4671, 1998.
- AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER, D.; VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 129, p. 154-169, 2010.
- ANO, Y.; SAKUDO, A.; KIMATA, T.; URAKI, R.; SUGIURA, K.; ONODERA, T. Oxidative damage to neurons caused by the induction of microglial NADPH oxidase in encephalomyocarditis virus infection. **Neurosci. Lett.**, v. 469, p. 39-43, 2010.
- ANO, Y.; SAKUDO, A.; ONODERA, T. Role of Microglia in Oxidative Toxicity Associated with Encephalomyocarditis Virus Infection in the Central Nervous System. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 7365-7374, 2012.
- ANUKUMAR, B; SHAHIR, P. Chandipura Virus infection in mice: the role of toll like receptor 4 in pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 125, 2012.
- ARAÚJO, T. P. **Caracterização morfológica e antigênica do vírus Juruáçá, isolado de morcego no Estado do Pará**. 2006. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal do Pará, Belém.
- ARAVALLI, R. N.; HU, S.; ROWEN, T. N.; PALMQUIST, J. M.; LOKENSGARD, J. R. TLR-2 mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 4189-4193, 2005.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K. & SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J. Med. Rev.**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BAILEY, S. L. et al. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T_H-17 cells in relapsing EAE. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 172-180, 2007.
- BALAKRISHNAN, A.; MISHRA, A. C. Immune response during acute Chadipirua virus infection in experimentally infected susceptible mice. **Virology Journal**, v. 5, p. 121-132, 2008.

- BARNA, M. et al. Six differences in the susceptibility to viral infection of the central nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v. 67, p. 31-39, 1996.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, 2008.
- BAUER, S.; KERR, B. J.; PATTERSON, P. H. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. **Nat Rev Neurosci.**, v. 8, p. 221-232, 2007.
- BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of Oligodendrocytes and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. **Physiological Review**, v. 81, n. 2, p. 871-927, 2001.
- BECHER, B.; PRAT, A.; ANTEL, J. P. Brain-immune connection: Immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. **Glia**, v. 29, n. 4, p. 293-304, 2000.
- BEDARD, K. M.; SEMLER, B. L. Regulation of picornavirus gene expression. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 7, p. 701-113, 2004.
- BEGOLKA, W. S.; VANDERLUGT, C. L.; RAHBE, S. M.; MILLER, S. D. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. **J. Immunol.**, v. 161, p. 4437-4446, 1998.
- BELLINI, W. J. et al. Nipah virus: An emergent paramyxovirus causing severe encephalitis in humans. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 5, p. 481-487, 2005.
- BELOV, G. A. et al. Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1463-1479, 2010.
- BELSHAM G. J; NORMANN, P. Dynamics of picornavirus RNA replication within infected cells. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 485-493, 2008.
- BENARROCH, E. E. Neuron-Astrocyte Interactions: Partnership for Normal Function and Disease in the Central Nervous System. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 80, n. 10, p. 1326-1338, 2005.
- BENVENISTE, E. N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **J. Mol. Med.**, v. 75, p. 165-173, 1997.
- BERGMANN, C. C.; LANE, T. E.; STOHLMAN, S. A. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 121-132, 2006.
- BERKA, U. et al. Human rhinovirus type 2 uncoating at the plasma membrane is not affected by a pH gradient but is affected by the membrane potential. **J Virol.**, v. 83, p. 3778-3787, 2009.
- BERTH, S. H.; LEOPOLD, P. L.; MORFINI, G. N. Virus-induced neuronal dysfunction and degeneration. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 5239-5259, 2009.

BEVENISTE, E. N. Cytokine actions in the central nervous system. **Cytokine and Growth Factor Review**, v. 9, p. 259-275, 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, p. 6466-6472, 1995.

BIACCHESSI, S.; LeBERRE, M.; LAMOUREUX, A.; LOUISE, Y.; LAURET, E.; BOUDINOT, P.; BRÉMONT, M. Mitochondrial antiviral signaling proteins plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA e DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 83, n. 16, p. 7815-7827, 2009.

BINDER, G. K.; GRIFFIN, D. E. Immune-mediated clearance of virus from the central nervous system. **Microbes Infect**, v. 5, p. 439-448, 2003.

BLOOM, D. C. et al. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 3-4, p. 246-256, 2010.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BOGDAN, C. The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 1361-1365, 1998.

BONKOWSKI, D. et al. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 8, n. 8, p. 2-12, 2011.

BRABEC, M. et al. Conformational changes, plasma membrane penetration, and infection by human rhinovirus type 2: role of receptors and low pH. **J Virol**, v. 77, p. 5370-5377, 2003.

BRABERS, N.A.; NOTTET, H.S. Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 36, p. 447-458, 2006.

BRAHIC, M. Theiler's virus infection of the mouse, or: of the importance of studying animal models. **Virology**, v. 301, p. 1-5, 2002.

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

BRAHIC, M.; ROUSSARIE, J. P. Axon-Myelin Interactions during a Viral Infection of the Central Nervous System. **Plos pathogens**, v. 5, n. 9, e1000519, 2009.

BRANDENBURG, B. et al. Imaging poliovirus entry in live cells. **Plos Biol.**, v. 5, e183, 2007.

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, p. 674-83, 1995.

BRIGHT, J. J.; RODRIGUEZ, M.; SRIRAM, S. Diferencial influence of interleukin-12 in the pathogenesis of autoimmune and virus-induced central nervous system demyelination. **Journal of Virology**, v. 73, p. 1637-1639, 1999.

BRODAL, P. **The Central Nervous System**. 4th ed. Oxford: Oxford, 2010, p. 5-26. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=WdATFQ0YUrMC&oi=fnd&pg=PR7&dq=The+Central+Nervous+System+Per+Brodal+&ots=TSuoiOAWV&sig=JfGwNX0iP0MZE9HXIbJDQtLtzP4#v=onepage&q=The%20Central%20Nervous%20System.%20Per%20Brodal&f=false>, Acesso em: 25 jul. 2013.

BROWN, M. A.; HURAL, J. Functions of IL-4 and control of its expression. **Crit Ver Immunol.**, v. 17, p. 1-32, 1997.

BUENZ, E. J. et al. Apoptosis of Hippocampal Pyramidal Neurons Is Virus Independent in a Mouse Model of Acute Neurovirulent Picornavirus Infection. **Am J Pathol.**, v. 175, p. 668-684, 2009.

BURDEINICK-KERR, R.; GRIFFIN, D. E. Gamma interferon-dependent, noncytolytic clearance of sindbis virus infection from neurons in vitro. **J. Virol.**, v. 79, n. 9, p. 5374-5385, 2005.

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

BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin-10 and Fc gamma receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2101-2108, 2005.

BYRNE, G. I.; SCHOBERT, C. S.; WILLIAMS, D. M.; KRUEGER, D. A. Characterization of gamma interferon-mediated cytotoxicity to chlamydia-infected fibroblasts. **Infection and Immunity.**, v. 57, n. 3, p. 870-874, 1989.

CAMERON, M. J. et al. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS), **Virus Research.**, v. 133, n. 1, p. 13-19, 2008.

CAMPBELL, G. L. et al. West Nile virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 519-529, 2002.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, p. 2068-2101, 1994.

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

CASALS, J. Immunological techniques for animals viruses. In: MARAMOROSH, K.; KOPROWSKI, H. **Methods in Virology**. New York : Academic Press, 1967, v. 3, p.75-81.
CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002.

- CHAKRABARTY, P. et al. Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. **Molecular Neurodegeneration**, v. 7, p. 36, 2012.
- CHAKRABORTY, S.; NAZMI, A.; DUTTA, K.; BASU, A. Neurons under viral attack: victims or warriors? **Neurochemistry International**, v. 56, p. 727-735, 2010.
- CHANG, J. R.; ZACZYNSKA, E.; KATSETOS, C. D.; PLATSOUKAS, C. D.; OLESZAK, E. L. Differential expression of TGF- β , IL-2, and other cytokines in the CNS of Theiler's murine encephalomyelitis virus-infected susceptible and resistant strains of mice. **Virology**, v. 278, p. 346-360, 2000.
- CHAUHAN, V. S., FURR, S. R., STERKA, D. G. JR., NELSON, D. A., MOERDYK-SCHAUWECKER, M., MARRIOTT, I., GRDZELISHVILI, V. Z. Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses. **Virology**, v. 10, p. 187-196, 2010.
- CHEN, N.; REISS, C. S. Innate immunity in viral encephalitis: role of C5. **Viral Immunology**, v. 15, n. 2, p. 365-372, 2002.
- CHEN, Z.; TATO, C. M.; MUUL, L. A. Laurence, and J. O'Shea, J. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. **Arthritis Rheum.**, v. 56, p. 2936-2946, 2007.
- CHESLER, D. A.; REISS, C. S. IL-12, while beneficial, is not essential for the host response to VSV encephalitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 131, p. 92-97, 2002.
- CHEVALIER, G.; SUBERBIELLE, E.; MONNET, C.; DUPLAN, V.; MARTIN-BLONDEL, G.; FARRUGIA, F.; Le MASSON, G.; LIBLAU, R.; GONZALEZ-DUNIA, D. Neurons are MHC class I-dependent targets for CD8 T cells upon neurotropic viral infection. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 11, e 1002393, 2011.
- CHU, K. et al. Atypical Brainstem Encephalitis Caused by Herpes Simplex Virus 2. **Arch Neurol.**, v. 59, p. 460-463, 2002.
- CIESIELSKA, A. et al. Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a murine model of the Parkinson's disease. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 63, p. 117-126, 2003.
- COLES, A. J. et al. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 46, p. 296-304, 1999.
- CONDIT, R. C. Principles of virology. In: KNIFE, D. M. & HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, cap. 2, p. 25-57.
- CONTESTABILE, A. Role of nitric oxide in cerebellar development and function: focus on granule neurons. **Cerebellum**, v. 11, n. 1, p. 50-61, 2012.
- COOKE, A. Th17 cells in inflammatory conditions. **Rev. Diabet. Stud.**, v. 3, p. 72-75, 2006.
- COOLS, N. et al. Regulatory T Cells and Human Disease. **Clinical and Developmental Immunology**, article ID 89195, 11 p., 2007.

COOPER, L. A; SCOTT, T. W. Differential Evolution of Eastern Equine Encephalitis Virus Populations in Response to Host Cell Type. **Genetics**, v. 157, p. 1403-1412, 2000.

CORRADIN, S. B.; FASEL, N.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y.; RANSIJN, A.; SMITH, J.; MAUEL, J. Induction of macrophage nitric oxide production by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha is enhanced by interleukin-10. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 2045-2048, 1993.

COUPER, K. N.; D. G. BLOUNT; E. M. RILEY. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J. Immunol.**, v. 180, p. 5771-5777, 2008.

COUTERLIER, J-P.; BROECK, J. V. & WOLF, S. F. Interleukin-12 gene expression after viral infection in the mouse. **Journal of Virology**, v. 69, p. 1955-1958, 1995.

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

CROTTY, S. et al. 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.

CURTIS, R. et al. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. **J Neurocytol.**, v. 17, p. 43-54, 1988.

DAL CANTO, M. C. et al. Two models of multiple sclerosis: Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. **Microscopy Research and Technique**, v. 32, n. 3, p. 215-229, 2005.

DALLAS, S.; MILLER, D. S.; BENDAYAN, R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. **Farmacol Rev.**, v. 58, p. 140-161, 2006.

DAS, S.; DUTTA, K.; KUMAWAT, K. L.; GHOSHAL, A.; ADHYA, D. et al. Abrogated inflammatory response promotes neurogenesis in a murine model of Japanese encephalitis. **PLoS One**, v. 6, p. e17225, 2011.

DAS, S.; MISHRA, M. K.; GHOSH, J.; BASU, A. Japanese Encephalitis Virus infection induces IL-18 and IL-1beta in microglia and astrocytes: correlation with in vitro cytokine responsiveness of glial cells and subsequent neuronal death. **J Neuroimmunol**, v. 195, p. 60-72, 2008.

DE PALMA, A. M et al Selective Inhibitors of Picornavirus Replication. **Medicinal Research Reviews**, 62 p., 2008.

DEL RÍO, L. A. et al. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 330-335, 2006.

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 Rev.**, v. 13, p. 4677-85, 2007.

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

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

DESHPANDE, S.; ZHENG, M.; LEE, S.; BANERJEE, K.; GANGAPPA, S.; KUMARAGURU, U.; ROUSE, B. Bystander activation involving T lymphocytes in herpetic stromal keratitis. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2902, 2001.

DI FRANCIA, M.; BARBIER, D.; MEGE, J. L.; OREHEK, J. Tumor necrosis factor- α levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 150, n. 5, pt. 1, p. 1453-1455, 1994.

DIAMOND, M. S. et al. The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. **Front Biosci.**, v. 1, n. 14, p. 3024-3034, 2009.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **The Cardiopulmonary and Critical Care Journal**, v. 118, p. 503-508, 2006.

DRESCHERS, S.; DUMITRU, C. A.; ADAMS, C. The cold case: are rhinoviruses perfectly adapted pathogens? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 2, p. 181-191, 2007.

DUGANDZIJA-NOVAKOVIC, S. et al. Clustering of Na⁺ channels and node of Ranvier formation in remyelinating axons. **J Neurosci**, v. 15, p. 492-503, 1995.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytologist.**, v. 174, p. 332-34, 2007.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune response. **Nature**, v. 20, p. 34-40, 2010.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

EAGAN, T. M.; GABAZZA, E. C.; D'ALESSANDRO-GABAZZA, C.; GIL-BERNABE, P.; AOKI, S.; HARDIE, J. A.; BAKKE, P. S.; WAGNER, P. D. TNF- α is associated with loss of lean body mass only in already cachectic COPD patients. **Respir. Res.**, v. 13, p. 48, 2012.

EDGAR, J. M., GARBERN, J. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. **J Neurosci Res.**, v. 76, p. 593-598, 2004.

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. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 11, p. 2461-2472, 2006.

EKKENS, M. J; SHEDLOCK, D. J.; JUNG, E.; TROY, A.; PEARCE, E. L.; SHEN, H.; PEARCE, E. J. Th1 and Th2 cells help CD8 T-cells responses. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2291-2296, 2007.

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

ERDMANN, N.B., WHITNEY, N.P., AND ZHENG, J. Potentiation of Excitotoxicity in HIV-1 Associated Dementia and the Significance of Glutaminase. **Clin. Neurosci. Res.**, v. 6, p. 315-328, 2006.

ESKANDARI, F.; WEBSTER, J. I.; STERNBERG, E. M. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 5, p. 251-265, 2003.

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 160-165, 2000.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 820-832, 2004.

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

FAULKNER, J. R. et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 2143-2155, 2004.

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.

FERNANDEZ-LIZARBE, S. et al. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. **Mol Immunol.**, v. 45, p. 2007-2016, 2008.

FILIPPI, M. et al. The effect of cladribine on T(1) 'black hole' changes in progressive MS. **J Neurol Sci.**, v. 176, p. 42-44, 2000.

FISHER, S. A.; GRAHAM, M. B.; KUEHNERT, M. J. et al. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 21, p.2235-2249, 2006.

FORGER, J. M. et al. Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2d system. **J Virol.**, v. 65, n. 9, p. 4950-4958, 1991.

FORTERRE, P. Defining Life: The Virus Viewpoint. **Orig Life Evol Biosph**, v. 40, p. 151-160, 2010.

FRISCHER, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Journal of Neurology**, v. 139, p. 1175-1189, 2009.

- FURR, S. R.; MARRIOTT, I. Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. **Front. Microbio.**, v. 3, p. 201, 2012.
- GARRIGA, D. et al. Insights into Minor Group Rhinovirus Uncoating: The X-ray Structure of the HRV2 Empty Capsid. **Plos Pathogenes**, v. 8, n. 1, e 1002473, 2012.
- GARTNER, L. P. et al. Sistema Nervoso. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1999, p.163.
- GASQUE, P.; DEAN, Y. D.; MCGREAL, E. P.; VANBEEK, J.; MORGAN, B. P. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. **Immunopharmacology**, v. 49, p. 171-186, 2000.
- GEIGER, K. D., T. et al. Interferon- γ protects against herpes simplex virus type 1-mediated neuronal death. **Virology**, v. 238, p. 189-197, 1997.
- GELDERBLOM, H. R. Structure and Classification of Viruses. In: BARON, S. **Medical Microbiology**. 4th ed. Galveston: Galveston (TX), 1996, cap. 41. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>>. Acesso em: 8 jan. 2013.
- GILDEN, D. H. et al. Neurologic Complications of the Reactivation of Varicella–Zoster Virus. **N Engl J Med**, v. 342, p. 635-645, 2000.
- GOH, K. J. et al. Clinical Features Of Nipah Virus Encephalitis Among Pig Farmers In Malaysia. **The New England Journal of Medicine**, v 342, n. 17, p. 1229-1235, 2000.
- GOMES, F. C. A. et al. Neurons induce GFAP promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. **Glia**, v. 26, p. 97-108, 1999.
- GRIFFIN, D. E. Viral encephalomyelitis. **Plos Pathogenes**, v. 7, n. 3, e1002004, 2011.
- GRIFFIN, D. E.; METCALF, T. Clearance of virus infections from the CNS. **Curr. Opin. Virol.**, v. 1, n. 3, p. 216-221, 2011.
- GRIFFITHS, M. R.; GASQUE, P.; NEAL, J. W. The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, vol. 68, no. 3, p. 217-226, 2009.
- GRIFFITHS, M. R.; GASQUE, P.; NEAL, J. W. The Regulation of the CNS Innate Immune Response Is Vital for the Restoration of Tissue Homeostasis (Repair) after Acute Brain Injury: A Brief Review. **International Journal of Inflammation**, Article ID 151097, 18 p, 2010.
- GRIGORIADIS, N.; HADJIGEORGIOU, G. M. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2006.
- GRUHNE, B. et al. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 2313-2318, 2009.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 33, p. 158-165, 1984.

GUIDOTTI, L. G., CHISARI, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 65-91, 2001.

GUPTA, N.; RAO, P. V. L. Transcriptomic profile of host response in Japanese encephalitis virus infection. **Virology Journal**, v. 8, p. 92, 2011.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis de dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

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

HARDY, R.; REYNOLDS, R. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. **J Neurosci Res**, v. 36, p. 121-126, 1993.

HARDY, R.; REYNOLDS, R. Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. **Development.**, v. 111, p. 1061-1080, 1991.

HARING, J. S.; PEWE, L. L.; PERLMAN, S. Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 1550-1555, 2002.

HARRISON, S. C. Principles of virus structure. In: KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, cap. 3, p. 60-98.

HAVELL, E. A. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. **J Immunol.**, v. 139, p. 4225-4231, 1987.

HAYNES, L. M. et al. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. **J Virol**, v. 75, n. 22, p. 10730-10737, 2001.

HEIL, F. et al. Species-specific recognition of singlestrandedRNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v. 303, p. 1526-1529, 2004.

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

HERBERT, R. P. Cytokines and olfactory bulb microglia in response to bacterial challenge in the compromised primary olfactory pathway. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 109, 2012.

HOWE, C. L. et al. Hippocampal protection in mice with an attenuated inflammatory monocyte response to acute CNS picornavirus infection. **Scientific Reports**, v. 2, p. 545, 2012.

HRISTOV, G. et al. Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. **J. Virol.**, v. 84, n. 12, p. 5909-5922, 2010.

HUANG, J.; LAM, G. Y.; BRUMELL, J. H. Autophagy Signaling Through Reactive Oxygen Species. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 11, p. 2215-2231, 2011.

HUNEYCUTT, B. S. et al. 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.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Disponível em: www.ictvdb.org. Acesso: 14 jun. 2013.

INOUE, A.; KOH, C. S.; YAHIKOZAWA, H.; YANAGISAWA, N.; YAGITA, H.; ISHIHARA, Y.; KIM, B. S. The level of tumor necrosis factor- α producing cells in the spinal cord correlates with the degree of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. **Int. Immunol.**, v. 8, p. 1001-1008, 1996.

IRELAND, D. D. C.; PALIAN, B. M.; REISS, C. S. Interleukin-12 receptor β 1 or receptor β 2 deficiency in mice indicates that interleukin-12 and interleukin-23 are not essential for host recovery from viral encephalitis. **Viral Immunol.**, v. 18, p. 397-402, 2005.

JACKSON, A. C. et al. Quantitative study of the infection in brain neurons in human rabies. **J Med Virol.**, v. 65, p. 614-618, 2001.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **J Infect Dis.**, v. 186, n. 2, p. 187-192, 2002.

JANSSEN, D. G. A. et al. A psychoneuroimmunological review on cytokines involved in antidepressant treatment response. **Hum. Psychopharmacol Clin Exp.**, v. 25, p. 201-215, 2010.

JEFFREY, I; COHEN, M. D. Epstein-Barr Virus Infection. **N Engl J Med.**, v. 343, p. 481-492, 2000.

JIN, S. Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. **Autophagy**, v. 2, p. 80-84, 2006.

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

JOHNSEN, I. B. **Intracellular signaling mechanism in the innate immune response to viral infection**. 2009. 120 f. Tese – Norwegian University of Science and Technology, Trondheim.

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

JONES, G.; POWER, C. Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. **Neurobiol Dis.**, v. 21, p. 1-17, 2006.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J. Immunol.**, v. 175, p. 3463-3468, 2005.

JORGENSEN, M. B. et al. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. **Exp Neurol.**, v. 120, p. 70-88, 1993.

JURGENS, H. A.; AMANCHERLA, K.; JOHNSON, R. W. Influenza infection induces neuroinflammation, alters hippocampal neuron morphology, and impairs cognition in adult mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 12, p. 3958-3968, 2012.

KANDEL, E. et al. **Principles of neuroscience**. 3th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1991, p 1050-1060.

KAUSHIK, D. K.; GUPTA M.; KUMAWAT, K. L.; BASU, A. NLRP3 Inflammasome: Key Mediator of Neuroinflammation in Murine Japanese Encephalitis. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. e32270, 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nature Immunology Review**, v. 7, n. 2, p. 131-137, 2006.

KAWANOKUCHI, J.; MIZUNO, T.; TAKEUCHI, H.; KATO, H.; WANG, J.; MITSUMA, N. & SUZUMURA, A. Production of interferon-gamma by microglia. **Mult Scler.**, v. 12, p. 558-64, 2006.

KEHRL, J. H. et al. 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. 1037-1050. 1986.

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

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses upon vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 369-377, 2007.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79-83, 2008.

KHAYRULLINA, T. et al. In Vitro Differentiation of Dendritic Cells in the Presence of Prostaglandin E 2 Alters the IL-12/IL-23 Balance and Promotes Differentiation of Th17 Cells. **J Immunol.**, v. 181, p.721-735, 2008.

KIM, S. U.; VELLIS, J. Microglia in health and diseases. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, p. 302-313, 2005.

KIMELBERG, H. K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 338-353, 2010.

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

KIRKEGAARD, K. Subversion of the Cellular Autophagy Pathway by Viruses. In: LEVINE, B.; YOSHIMORI, T.; DERETIC, V. **Autophagy in Infection and Immunity**. Cap.: Current Topics in Microbiology and Immunology. Texas: Springer, 2009, v. 335, p 323-333.

KIRKMAN, N. J.; LIBBEY, J. E.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S.; FUJINAMI, R. S. Innate but not adaptative immune response contribute to behavioral seizures following viral infection. **Epilepsia**, v. 51, n.3, p. 454-564, 2010.

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

KNIGH, R. A.; VERKHRATSKY, A. Neurodegenerative diseases: failures in brain connectivity? **Cell Death Differ**, v. 17, p. 1069-1070, 2010.

KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide and autoimmune diseases: cytotoxic or regulatory mediator. **Immunol. Today**, v. 19, p. 556-561, 1998.

KOMATSU, T., IRELAND, D. D. C., CHUNG, N., DORE, A., YODER, M. & SHOSHKES REISS, C. Regulation of the BBB during viral encephalitis: roles of IL-12 and NOS. **Nitric Oxide**, v. 3, p. 327-339, 1999.

KOMATSU, T.; IRELAND, D. D. C.; REISS, C. S. IL-12 and viral infections. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 9, p. 277-285, 1998.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 751-756, 2008.

KOPF, M.; LE GROS, G.; BACHMANN, M.; LAMERS, M. C.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. **Nature**, v. 362, p. 245-248, 1993.

KORNELISSE, R. F.; HACK, C. E.; SAVELKOUL, H. F. J.; KRAAN, T. C. T. M. V. D. P.; HOP, W. C. J.; MIERLO, G. V.; SUUR, M. H.; NEIJENS, H. J. & GROOT, R. Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 877-881, 1997.

KOSSODO, S. et al. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, v. 91, p. 536-540, 1997.

KOTILLIL, S.; CHUN, T-W; MOIR, S.; LIU, S.; MCLAUGHLIN, M.; HALLAHAN, C. W.; MALDARELLI, F.; COREY, L.; FAUCI, A. S. Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer function. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 1038-1045, 2003.

- KOTLER, D. P. Cachexia. **Ann. Intern. Med.**, v. 133, n. 8, p. 622-634, 2000.
- KOYAMA, S.; ISHII, K. J.; COBAN, C.; AKIRA, S. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, 6 p., 2008.
- KOZIEL, M. J. Cytokines in Viral Hepatitis. **Semin Liver Dis.**, v. 19, n. 2, p. 157-169, 1999.
- KRAFT-TERRY, S. D.; BUCH, S. J.; FOX, H. S.; GENDELMAN, H. E. A coat of many colors: Neuroimmune crosstalk in human immunodeficiency virus infection. **Neuron Review**, v. 64, p. 133-145, 2009.
- KRAMER, J. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 1083-1093, 2007.
- KREUTZER, M. et al. Axonopathy Is Associated with Complex Axonal Transport Defects in a Model of Multiple Sclerosis. **Brain Pathology**, v. 22, n. 4, p. 454-471, 2012.
- KRISHNASWAMY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D. S. The human mast cell: an overview. **Methods Mol. Biol.**, v. 315, p. 13-34, 2006.
- KUCHROO, V. K. et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune therapy. **Cell**, Cambridge, v. 80, n. 5, p. 707-718, 1995.
- KUMAR, H. et al. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1795-1803, 2006.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 621-625, 2009.
- KUMAR, N. B.; KASI, A.; SMITH, T. et al. Cancer Cachexia: Traditional Therapies and Novel Molecular Mechanism-Based Approaches to Treatment. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 11, p. 107-117, 2010.
- LALIVE, P. H. et al. Highly reactive anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies differentiate demyelinating diseases from viral encephalitis in children. **Mult Scler**, v. 17, n. 3, p. 297-302, 2011.
- LAMMAS, D. A.; CASANOVA, J. L.; KUMARARATNE, D. S. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN- γ) pathway. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, p. 417-425, 2000.
- LANSBURY, P. T.; LASHUEL, H. A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. **Nature**, v. 43, p. 774-777, 2006.
- LAU, S. K. P. et al. Complete Genome Analysis of Three Novel Picornaviruses from Diverse Bat Species. **Journal of Virology**, v. 85, n. 17, p. 8819-8828, 2011.
- LAU, S. K., et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as

reservoir for acute, self-limiting infection that allows recombination events. **J. Virol.**, v. 84, p. 2808-2819, 2010a.

LAU, S. K., et al. Identification and complete genome analysis of three novel paramyxoviruses, Tuhoko virus 1, 2 and 3, in fruit bats from China. **Virology**, v. 404, p. 106-116, 2010b.

LAU, S. K., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, p. 14040-14045, 2005.

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

LEE, S. C.; DICKSON, D. W.; LIU, W.; BROSNAN, C. F. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. **J. Neuroimmunol.** v. 46, p. 19-24, 1993.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2004.

LEVINGS, M. K.; SCHRADER, J. W. IL-4 inhibits the production of TNF-alpha and IL-12 by STAT6-dependent and -independent mechanisms. **J Immunol.**, v. 162, p. 5224-5229, 1999.

LEVISON, S. W.; GOLDMAN, J. E. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat brain. **Neuron**, v. 10, p. 201-212, 1993.
LEVITE, M. Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 8, n. 4, p. 460-471, 2008.

LEVITZ, R. et al. Induction of IL-6 and CCL5 (RANTES) in human respiratory epithelial (A549) cells by clinical isolates of respiratory syncytial virus is strain specific. **Virology Journal**, v. 9, p. 190, 2012.

LEVY, A. et al. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 1, p. 16-23, 2010.

LI, L., et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **J. Virol.**, v. 84, p. 6955-6965, 2010.

LI, X. et al. KSRP: A checkpoint for inflammatory cytokine production in astrocytes. **Glia**, v. 60, n. 11, p. 1773-1784, 2012.

LI, Y. et al. Coronavirus neurovirulence correlates with the ability of the virus to induce proinflammatory cytokine signals from astrocytes and microglia. **J Virol.**, v. 78, p. 3398-3406, 2004.

LIN, W. et al. HIV and HCV Cooperatively Promote Hepatic Fibrogenesis via Induction of Reactive Oxygen Species and NFκB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 4, p. 2665-2674, 2011.

LIPTON, H. L. et al. Differential usage of carbohydrate co-receptors influences cellular tropism of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of the central nervous system. **Glycoconj J.**, v. 23, p. 39-49, 2006.

LIPTON, H. L. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. **Infect Immuno.**, v. 11, p. 1147-1155, 1975.

LIU, A. et al. The Glial or Neuronal Fate Choice of Oligodendrocyte Progenitors Is Modulated by Their Ability to Acquire an Epigenetic Memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 27, p. 7339-7343, 2007.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S232-S240, 2006.

LUND, J. M. et al. Cutting Edge: Plasmacytoid Dendritic Cells Provide Innate Immune Protection against Mucosal Viral Infection In Situ. **J Immunol.**, v. 177, p. 7510-7514, 2006.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos da resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACK, C. L. et al. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.**, v. 144, p. 68-79, 2003.

MACKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; BUCK, A.; CURTIS, J. D.; DIBBLE, J. P.; HUSTON, G.; TIGHE, M.; HAMADA, H.; SELL, S.; DUTTON, R. W.; SWAIN, S. L. IL-10 Deficiency Unleashes an Influenza-Specific T_H17 response and enhances survival against high-dose challenge. **The journal of Immunology**, v. 182, p. 7353-7363, 2009.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MANDER, P. K.; JEKABSONE, A.; BROWN, G. C. Microglia Proliferation Is Regulated by Hydrogen Peroxide from NADPH Oxidase. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 1046-1052, 2006.

MANSFIELD, K. L. et al. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1781-1794, 2009.

MAO, N et al. An aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 6 in Anhui province, China. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 3, p. 441-445, 2010.

MARIN-PADILLA, M. Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: a Golgi study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 357, p. 554-572, 1995.

MARQUES, C. P.; CHEERAN, M. C. et al. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. **Journal of neurovirology**, v. 35, Suppl 1, p. 313-318, 2008.

- MARTINEY, J. A.; CUFF, C.; LITWAK, M.; BERMAN, J.; BROSNAN, C. F. Cytokine-induced inflammation in the central nervous system revisited. **Neurochem. Res.**, v. 23, p. 349-359, 1998.
- MASON, J. L. et al. Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 7046-7052, 2001.
- MATSUE, H.; EDELBAUM, D.; SHALHEVET, D.; MIZUMOTO, N.; YANG, C.; MUMMERT, M. E.; OEDA, J.; MASAYASU, H.; TAKASHIMA, A. Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cells During Antigen Presentation. **The Journal of immunology**, v. 171, p. 3010-3018, 2003.
- MCKINSTRY, K. K. et al. título. **J. Immunol.**, v. 182, p. 7353-7363, 2009.
- MELCHJORSEN, J.; MATIKAINEN, S.; PALUDAN, S. R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by Herpes Simplex virus. **Viruses**, v. 1, p. 737-759, 2009.
- MENACHERY, V. D. **The impact of interferon regulatory factor 3 on the immune response to herpes simplex virus type I infection**. 2010. 148 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – University of Washington, Saint Louis.
- MESTRE, L.; CORREA, F.; DOCAGNE, F.; CLEMENTE, D.; GUAZA, C. The synthetic cannabinoid Win 55-212, 2 increases COX-2 expression and PGE2 release in murine brain derived endothelial cells following Theiler's virus infection. **Biochem. Farmacol.**, v. 72, p. 869-880, 2006.
- MILLER, S. D. et al. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. **Nature Medicine**, v. 3, p. 1133-1136, 1997.
- MISRA, U. K.; TAN, C. T.; KALITA, J. Viral encephalitis and epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n 13, p.13-18, 2008.
- MITEW, S. et al. Focal demyelination in Alzheimer's disease and transgenic mouse models. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 5, p. 567-577, 2010.
- MOCHEL, N. S. R. et al. Hepatocyte NAD(P)H Oxidases as an Endogenous Source of Reactive Oxygen Species During Hepatitis C Virus Infection. **Hepatology**, v. 52, p. 47-59, 2010.
- MOGENSEN, T. H.; PALUDAN, S. R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 131-150, 2001.
- MOMMA, S.; JOHANSSON, C. B; FRISEN, J. Get to know your stem cells. **Curr Opin Neurobiol**, v. 10, p. 45-49, 2000.
- MONATH, T. P. et al. Variation in virulence for mice and rhesus monkeys among St. Louis encephalitis virus strains of different origin. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 5, p. 948-962, 1980.

- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R., WILSON, M. M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, n. 4, p. 735-743, 2006.
- MOURA NETO, V.; MALLAT, M.; JEANFET, C. Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. **The EMBO Journal**, v. 2, p. 1243-1301, 1983.
- MOYNAGH, P. N. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. **J. Anat.**, v. 207, p. 265-269, 2005.
- MURPHY, G. M.; YANG, L.; CORDELL, B. Macrophage Colony-stimulating Factor Augments β -Amyloid-induced Interleukin-1, Interleukin-6, and Nitric Oxide Production by Microglial Cells. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 273, n. 33, p. 20967-20971, 1998.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J.**, v. 417, p. 1-13, 2009.
- MURRAY, P. J.; R. A. YOUNG. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3087-3095, 1999.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5th ed. Elsevier, 2006, cap. 56. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=Jhv8Mp2b_EkC&pg=PT408&dq=MURRAY,+P.+R.;+ROSENTHAL,+K.+S.;+PFALLER,+M.+A.+Microbiologia+M%C3%A9dica.+5th+ed&hl=pt-PT&sa=X&ei=TY79UOz2Kae30gHIglGoAQ&ved=0CDIQ6AEwAA>. Acesso em: 6 jan. 2013.
- NAKAMURA, Y. Regulation factors for microglial activation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 945-953, 2002.
- NANSEN, A. et al. CCR2+ CCR5+ CD8+ T cells increase during viral infection and migrates to sites of infections. **Eur J Immunol.**, v. 30, p. 1797-1806, 2000.
- NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, v. 132, p. 288-95, 2009.
- NGUYEN, K. B. et al. Coordinated and Distinct Roles for IFN- γ , IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. **J Immunol.**, v. 169, p. 4279-4287, 2012.
- NGUYEN, T. et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 3030-3034, 1992.
- NJENGA, M. K. et al. The immune system preferentially clears Theiler's virus from the gray matter of the central nervous system. **J. Virol.**, v. 71, p. 8592-8601, 1997.
- OBERHEIM, N. A.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. **Methods Mol Biol.**, v. 814, p. 23-45, 2012.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T_H1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature reviews immunology**, v. 7, p. 425-428, 2007.

OLESZAK, E. L.; CHANG, J. R.; FRIEDMAN, H.; KATSETOS, C. D.; PLATSOUCAS, C. D. Theiler's Virus Infection: a Model for Multiple Sclerosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 17, n. 1, p. 174-207, 2004.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **J Infect.**, v. 52, p. 420-32, 2006.

OLSON, J. K.; GIRVIN, A. M. & MILLER, S. D. Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglial following infection with Theiler's virus. **Journal of Virology**, 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, p. 3916-3924, 2004.

ORANGE, J. S.; BIRON, C. A. Characterization of early IL-12, IFN- α and TNF effectson antiviral state and NK cells response during murine cytomegalovirus infection. **The Journal of Immunology**, v. 156, p. 4746-4756, 1996.

PAGENSTECHER, A. et al. Astrocyte-Targeted Expression of IL-12 Induces Active Cellular Immune Responses in the Central Nervous System and Modulates Experimental Allergic Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4481-4492, 2000.

PALMA, J. P.; YAUCH, R. L.; KANG, H. K.; LEE, H. G.; KIM, B. S. Preferential induction of IL-10 in APC correlates with a switch from Th1 to Th2 response following infection with a low pathogenic variant of Theiler's virus. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4221-4230, 2002.

PARISH, I. A.; KAECH, S. M. IL-7 Knocks the Socs Off Chronic Viral Infection. **Cell**, v. 144, p. 467-468, 2011.

PARK H., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 1133-1141, 2005.

PARRONCHI, P. et al. IL-4 and IFN (α and γ) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. **J. Immunol.**, v. 149, p. 2977-2983, 1992.

PATHAK, H. B. et al. Picornavirus Genome Replication: Assembly And Organization Of The Vpg Uridylylation Ribonucleoprotein (Initiation) Complex. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 22, p. 16202-16213, 2007.

PEREIRA, F. E. L; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 387-400, 2003.

PEYROT, F.; DUCROCQ, C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. **J. Pineal Res.**, v. 45, p. 235-246, 2008.

PICKUP, J. C.; FRCPAHT, D. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 813-823, 2004.

PINHEIRO, F. P. et al. Aspectos clínicos-epidemiológicos dos arbovírus. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição as Ciências Biológicas e a Medicina Tropical**. v. 1. Belém, PA, 1986, p. 375-408.

PLAKHOV, I. V. et al. The Earliest Events in Vesicular Stomatitis Virus Infection of the Murine Olfactory Neuroepithelium and Entry of Central Nervous System. **Virology**, v. 209, p. 257-262, 1995.

POLLMACHER, T., HAACK, M., SCHULD, A., REICHENBERG, A. & YIRMIYA, R. Low levels of circulating inflammatory cytokines – do they affect human brain functions? **Brain Behav. Immun.**, v. 16, p. 525-532, 2002.

PONOMAREV, E. D.; MARESZ, K.; TAN, Y.; DITTEL, B. N. CNS-Derived Interleukin-4 Is Essential for the Regulation of Autoimmune Inflammation and Induces a State of Alternative Activation in Microglial Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10714-10721, 2007.

POZNER, R. G. et al. Differential Astrocyte Response to Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection. **Intervirology**, v. 48, p. 279-284, 2005.

PRASAD, B. V. V.; SCHMID, M. F. Principles of Virus Structural Organization. In: ROSSMANN, M. G.; RAO, V. B. **Viral Molecular Machines**, Advances in Experimental Medicine and Biology. New York: Springer, 2012, cap. 3, p. 726.

QIN, L. et al. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. **Autophagy**, v. 6, p. 239-247, 2008.

RACANIELLO, V. Neurotropic picornavirus. In: REISS, C. S. **Neurotropic viral infections**. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008, cap. 1, p. 3-25.

RACANIELLO, V. R. *Picornaviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M., HONLEY, P. M. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, cap. 24, p. 796-838.

RAKIC, P.; KNYIHAR-CSILLIK, E.; CSILLIK, B. Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, p. 9218-22, 1996.

REED, L. J.; MUEYCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 439-497, 1938.

REISS, C. S., PLAKHOV, I. V.; KOMATSU, T. Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 855, p.751-761, 1998.

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

REMPEL, J. D. et al. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. **Virology**, v. 318, p. 381-392, 2004.

RHOADES, R. E.; TABOR-GODWIN, J. M.; TSUENG, G.; FEUER, R. Enterovirus infections of the central nervous system. **Virology**, v. 411, p. 288-305, 2011.

RICO-HESSE, R. et al. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 5278-5281, 1995.

RIO HORTEGA, D. P. Histogenesis y evolucion normal; exodo y distribucion regional de la microglia. **Memor Real Soc Esp Hist Nat.**, v. 11, p. 213-268, 1921.

ROBBINS, S. H.; BESSOU, G.; CORNILLON, A.; ZUCCHINI, N.; RUPP, B.; RUZSICS, Z.; SACHER, T.; TOMASELLO, E.; VIVIER, E.; KOSZINOWSKI, U. H.; DALOD, M. Natural killer cells promote early CD8 T cells response against cytomegalovirus. **Plos Pathogenes**, v. 3, n. 8, p. e123, 2007.

ROBERT, R. A. et al. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, v. 276, n. 2, p. 85-94, 2010.

ROBINSON, J.M.; SEGUCHI, H.; BADWEY, J.A. **Active oxygen and nitrogen species in biology: from cytotoxic agents or signaling intermediates.** *Histochem Cell Biology*, v. 122, p. 173-275, 2004.

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, p. 942-964, 2004.

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

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

RODRIGUEZ, M.; OLESZAK, E.; LEIBOWITZ, J. Theiler's Murine Encephalomyelitis: a Model of Demyelination and Persistence of virus. **Critical Reviews in Immunology.**, v. 7, n. 4, p. 325-365, 1987.

RODRIGUEZ, M.; PIERCE, M. L.; HOWIE, E. A. Immune response gene products (Ia antigens) on glial and endothelial cells in virus-induced demyelination. **J. Immunol.**, v. 138, p. 3438- 3442, 1987.

RONCAROLO, M. G. et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 28-50, 2006.

ROSSI, D.; VOLTERRA, A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. **Brain Res Bull**, v. 8, p. 224-232, 2009.

- ROTTENBERG, M.; KRISTENSSON, K. Effects of interferon- γ on neuronal infection. **Viral Immunology**, v. 15, p. 247-260, 2002.
- ROUSE, B. T.; HOROHOV, D. W. Immunosuppression in viral infections. **Rev. Infect. Dis.**, v. 8, p. 850-873, 1986.
- ROUSSARIE, J. P. et al. Axon Myelin Transfer of a Non-Enveloped Virus. **Plos One**, v. 2, n. 12, e1331, 2007b.
- ROUSSARIE, J. P.; RUFFIE, C.; BRAHIC, M. The role of myelin in Theiler's virus persistence in the central nervous system. **Plos Pathog.**, v. 3, e23, 2007a.
- ROZENBERG, F., DEBACK, C., et al. Herpes Simplex Encephalitis: From Virus to Therapy. **Infect Disord Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 235-250, 2011.
- RUBIO, N.; CERCIAT, M.; UNKILA, M.; GARCIA-SEGURA, S. M.; AREVALO. An in vitro experimental model of neuroinflammation: the induction of interleukin-6 in murine astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus, and its inhibition by oestrogenic receptor modulators. **Immunology**, v. 133, p. 360-369, 2011.
- RUBIO-PEREZ, J. M.; MORILLAS-RUIZ, J. M. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. **The Scientific World Journal**, v. 15, article ID 756357, 2012.
- RUECKERT, R. R. *Picornaviridae* and their replication. In: KNIPE, D. M., HONLEY, P. M. **Fields Virology**. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, p. 609-654.
- RUS, H.; NICULESCU, F. The complement system in central nervous system diseases. **Immunol. Res.**, v. 24, p. 24-86, 2001.
- SAAS, P., WALKER, P.R., QUIQUEREZ, A.L., CHALMERS, D.E., ARRIGHI, J.F., LIENARD, A., BOUCRAUT, J., AND DIETRICH, P.Y. A self-defence mechanism of Astrocytes against Fas-mediated death involving interleukin-8 and CXCR2. **Neuroreport**, v. 13, p. 1921-1924, 2002.
- SADLACK, B., H. et al.. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. **Cell**, v. 75, p. 253-261, 1993.
- SAHA, S. et al. Identification of Japanese encephalitis virus-inducible genes in mouse brain and characterization of GARG39/IFIT2 as a microtubule-associated protein. **J Gen Virol.**, v. 87, p. 3285-3289, 2006.
- SAHAN, R. N.; PAHAN, K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene glial cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, p. 929-947, 2006.
- SAIJO, K.; CROTTI, A. GLASS, C. K. Regulation of Microglia Activation and Deactivation by Nuclear Receptors. **Glia**, v. 61, p. 104-111, 2013.
- SAITO, V. M. N. **Modulação do sistema endocanabinoide sobre respostas neuroinflamatórias em modelo animal de encefalite causada pelo vírus *herpes simplex***

tipo 1. 2011. 73 F. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SALZER, J. L. Polarized domains of myelinated axons. **Neuron**, v. 40, p. 297-318, 2003.

SAMUEL, M. A.; DIAMOND, M. Alpha/Beta Interferon Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Restricting Cellular Tropism and Enhancing Neuronal Survival. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13350-13361, 2005.

SÁNCHEZ-ISLAS, E.; LEÓN-OLEA, M. Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 3, p. 141-149, 2004.

SANTOS, S. B.; MUNIZ, A. L.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Mielopatia Associada ao Htlv-I. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, p. 11-17, 2009.

SAPKAL, G. N. et al. Enteroviruses in Patients with Acute Encephalitis, Uttar Pradesh, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 295-298, 2009.

SAVARIN, C. et al. Monocytes regulate T cell migration through the glia limitans during acute viral encephalitis. **J Virol.**, v. 84, p. 4878-4888, 2010.

SAVARIN, C.; BERGMANN, C. C. Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 8, p. 472-479; 2008.

SCHACHTELE, S. J.; HU, S. et al. Herpes simplex virus induces neural oxidative damage via microglial cell Toll-like receptor-2. **Journal of neuroinflammation**, v. 7, n. 6, p. 495-505, 2010.

SCHANDENE, L., C. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4368-4374, 1994.

SCHERZ-SHOVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends Cell Biol.**, v. 17, p. 422-427, 2007.

SCHWARTZ, M. et al. T-cell immunity as a therapeutic approach for neurodegenerative conditions: the role of innate immunity. **Neuroscience**, v. 158, p. 1133-42, 2009.

SEDDIKI, N. et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. **Brief Definitive Report**, v. 203, n. 7, p. 1693-1700, 2006.

SEIDEL, C.; BICKER, G. Nitric oxide and cGMP influence axonogenesis of antennal pioneer neurons. **Development**, v. 127, p. 4541-4549, 2000.

SERGEJEVA, S. et al. IL-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.**, v. 33, p. 248-253, 2005.

SERGERIE, Y.; RIVEST, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. **The Journal of infectious diseases**, v. 204, n. 2, p. 2899-2912, 2007.

SHEN, H-M.; LIU, Z-G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 928-939, 2006.

SHINDO, N. et al. Human Retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological Study and Molecular Epidemiology of HTLV Type 2 Isolates. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 18, n. 1, p. 71-77, 2002.

SILVA, A. K. G.; DE PAULA, M. L.; FERREIRA, A. P. Imunopatologia da encefalomielite auto-imune experimental murina mediada por linfócitos T. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 34, n. 3, p. 205-212, 2008.

SILVA, J. F. C. **Variações Genéticas Da Glicoproteína B do Citomegalovírus Humano e Associação com o Nível de Citocinas em Pacientes Submetidos ao Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas**. 2010. 123f. Tese (doutorado em Odontologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, M. T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. **J Leukoc Biol.**, v. 87, p. 805-813, 2010.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 89-102, 2010.

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

SOLA, C. et al. Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 1275-1283, 2002.

SOLOMON, T. et al. Viral encephalitis: a clinician's guide. **Practical Neurology**, v 7, p. 288-305, 2007.

SOLOMON, T. Flavivirus encephalitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 370-378, 2004.

SOLOMON, T.; LEWTHWAITE, P.; PERERA, D.; CARDOSA, M. J.; MCMINN, P.; OOI, M. H. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, p. 778-790, 2010.

SOLOMON, T.; NI, H.; BEASLEY, D. W.; EKKELENKAMP, M.; CARDOSA, M. J.; BARRETT, A. D. Origin and Evolution of Japanese Encephalitis Virus in Southeast Asia. **Journal of Virology**, v. 77, n. 5, p. 3091-3098, 2003.

SOLOMON, T.; WILLISON, H. Infectious causes of acute flaccid paralysis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 375-381, 2003.

SOUKY-FAULKNER, A. et al. Requirement of NOX2 and Reactive Oxygen Species for Efficient RIG-I-Mediated Antiviral Response through Regulation of MAVS Expression. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 6, e1000930, 2010.

SOUSA, A. E. et al. CD4 T Cell Depletion Is Linked Directly to Immune Activation in the Pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but Only Indirectly to the Viral Load. **J Immunol**, v. 169, p. 3400-3406, 2002.

STEINMAN, L. Nuanced roles of cytokines and three major human brain disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 3557-3563, 2008.

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

STENGER, S. et al. Tissue Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase is Closely Associated with Resistance to *Leishmania major*. **J Exp Med.**, v. 180, p. 783 -793, 1994.

STREIT, W. J.; WALTER, S. A.; PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 563-581, 1999.

SUZUKI, Y.; CLAFLIN, J.; WANG, X.; LENGI, A. & KIKUCHI, T. Microglial and macrophages as innate produce interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 83-90, 2005.

TACKE, R. S.; LEE, H. C.; GOH, C.; COURTNEY, J.; POLYAK, S. J.; ROSEN, H. R.; HAHN, Y. S. Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 343-353, 2012.

TARDY, M. Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth. **An Acad Bras Cienc**, v. 74, p. 683-90, 2002.

TAYLOR, M. P. et al. Role of Microtubules in Extracellular Release of Poliovirus. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6599-6609, 2009.

TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 821-827, 2003.

THEIL, D. J.; TSUNODA, I.; LIBBEY, J. E.; DERFUSS, T. J; FUJINAMI, R. S. Alterations in cytokine but not chemokine mRNA expression during three distinct Theiler's virus infections. **J. Neuroimmunol.**, v. 104, p. 22-30, 2000.

TILLEUX, S.; HERMANS, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **J. Neurosci. Res.**, v. 85, p. 2059-2070, 2007.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A et al. Surto de dengue em Boa Vista, Território de Roraima, Brasil, **Bol Epidemiol MS**, v.14, p.93-100, 1982.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., et al. 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: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Instituto Evandro Chagas, Belém, 1998, p 19-31.

TRIANTAFILOU, K.; TAKADA, Y.; TRIANTAFILOU, M. Mechanisms of integrin-mediated virus attachment and internalization process. **Crit Rev Immunol.**, v. 21, p. 311-322, 2001.

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

TUTHILL, R. J. et al. Picornaviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 343, p 43-89, 2010.

TYLER, K. L. Emerging viral infections of the central nervous system: part 2. **Arch. Neurol.**, v. 66, p. 1065-1074, 2009.

ULRICH, R. et al. Limited remyelination in Theiler's murine encephalomyelitis due to insufficient oligodendroglial differentiation of nerve/glial antigen 2 (NG2)-positive putative oligodendroglial progenitor cells. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 34, p. 603-620, 2008.

UMEMURA, M. et al. IL-17-Mediated Regulation of Innate and Acquired Immune Response against Pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin Infection. **J. Immunol.**, v. 178, p. 3786-3796, 2007.

UPLA, P. et al. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. **Mol Biol Cell**, v. 15, p. 625-636, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN BEEK, J. ELWARD, K.; GASQUE, P. Activation of complement in the central nervous system: role in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 992, p. 56-71, 2003.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L. **Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Virus**. San Diego: Academic Press, 2000, p. 563-583.

VAN-HETEREN, J. T.; ROZENBERG, F.; ARONICA, E.; TROOST, D.; LEBON, P.; KUIJPERS, T. W. Astrocytes produce interferon- α and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8 in Aicardi-Goutières syndrome. **Glia**, v. 56, p. 568-78, 2008.

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

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

VERMA, S.; LO, Y.; CHAPAGAIN, M.; LUM, S.; KUMAR, M.; GURJAV, U.; LUO, H.; NAKATSUKA, A.; NERURKAR, V. R. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. **Virology**, v. 385, p. 425- 433, 2009.

VIANNA, R. A. O. et al. Manifestações clínicas associadas ao herpesvirus humano tipo 6, incluindo aspectos da infecção na síndrome da imunodeficiência adquirida. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 14, n. 1, p. 49-53, 2002.

VIDY, A.; CHELBI-ALIX, M. & BLONDEL, D. Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways. **Journal of Virology**, v. 79, p. 14411-14420, 2005.

VILELA, M. C. et al. Role of IL-4 in an experimental model of encephalitis induced by intracranial inoculation of herpes simplex virus-1 (HSV-1). **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 69, n. 2-A, p. 237-241, 2011.

VIVITHANAPORN, P. et al. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Neuroimmune Activation and Potentiates Human Immunodeficiency Virus-1 Neurotoxicity. **Plos One**, v. 5, n. 9, p. e12856, 2010.

WAHL, S. M. et al. TGF- β : the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 76, p. 15-24, 2004.

WAKEFIELD, D. et al. The role of PAMPs and DAMPs in the pathogenesis of acute and recurrent anterior uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 94, p. 271-274, 2010.

WANG, J.; WU, Z.; JIN, Q. COPI Is Required for Enterovirus 71 Replication. **Plos One**, v. 7, n. 5, e38035, 2012.

WANG, S. M. et al. The severity of Streptococcus pyogenes infections in children is significantly associated with plasma levels of inflammatory cytokines. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 2, p. 165-169, 2008.

WANG, S-M.; LEI, H-Y.; LIU, C-C. Cytokine Immunopathogenesis of Enterovirus 71 Brain Stem Encephalitis. **Clinical and Developmente Immunology**, article ID 876241, 8 pages, 2012.

WANG, Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, p. 276-281, 2008.

WARK, P. A. B. et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 6, p. 937-947, 2006.

- WEAVER, S. C. et al. Recombinational History and Molecular Evolution of Western Equine Encephalomyelitis Complex Alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 613-623, 1997.
- WIESE, S.; KARUS, M.; FAISSNER, A. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, article 120, 2012.
- WILLOUGHBY, R. E. et al. Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. **N Engl J Med**, v. 352, p. 2508-2514, 2005.
- WOO, P. C., et al. Comparative analysis of 12 genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. **J. Virol.**, v. 81, p. 1574-1585, 2007.
- WOO, P. C., et al. Molecular diversity of coronaviruses in bats. **Virology**, v. 351, p. 180-187, 2006.
- WOOD, P. L. Neurodegeneration and aldehyde load: from concept to therapeutics. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 31, n. 5, p. 296-297, 2006.
- WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nat Med.**, v. 12, p. 1005-1015, 2006.
- XIE, M-H. et al. Interleukin (IL)-22, a Novel Human Cytokine That Signals through the Interferon Receptor-related Proteins CRF2-4 and IL-22R. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31335-31339, 2000.
- YANG, X.; SUZUKI, Y. Microglia produce IFN-gamma independently from T cells during acute toxoplasmosis in the brain. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 27, p. 599-605, 2007.
- YUAN, J. et al. Th17 Cells Contribute to Viral Replication in Cocksackievirus B3-Induced Acute Viral Myocarditis. **J Immunol**, v. 185, p. 4004-4010, 2010.
- ZAISS, A. K. et al. Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. **Journal of Virology**, v. 76, n. 9, p. 4580-4590, 2002.
- ZHANG, D.; HU, X.; QIAN, L.; CALLAGHAN, J. P. O.; HONG, J-S. Astroglia in CNS pathologies: is there a role for microglia? **Mol. Neurobiol.**, v. 41, p. 232-241, 2010.
- ZHANG, R. L. et al. Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, p. 1201-1212, 2007.
- ZHANG, Y.; BARRES, B. A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 5, p. 588-594, 2010.
- ZHU, Z.; ZHANG, Q.; YU, Z.; ZHANG, L.; TIAN, D.; ZHU, S.; BU, B.; XIE, M.; WANG, W. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo. **Glia**, v. 55, p. 546-558, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Taxonomia dos vírus da família *Picornaviridae* em vigor

Gênero	Espécie
<i>Aphtovirus</i>	<i>Vírus da rinite bovina B</i> <i>Vírus da rinite equina A</i> <i>Vírus da doença de pé e mão</i>
<i>Aquamavirus</i>	<i>Aquamavirus A</i>
<i>Avihepatovirus</i>	<i>Vírus da hepatite de pato A</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Vírus da encefalomiocardite</i> <i>Theilovirus</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Cosavirus A</i>
<i>Dicipivirus</i>	<i>Cadicivirus A</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus bovino</i> <i>Enterovirus humano A</i> <i>Enterovirus humano B</i> <i>Enterovirus humano C</i> <i>Enterovirus humano D</i> <i>Rinovirus humano A</i> <i>Rinovirus humano B</i> <i>Rinovirus humano C</i> <i>Enterovirus suíno B</i> <i>Enterovirus símio A</i>
<i>Erbovirus</i>	<i>Vírus da rinite equina B</i>
<i>Hepatovirus</i>	<i>Vírus da hepatite A</i>
<i>Kobuvirus</i>	<i>Vírus Aichi</i> <i>Kobuvirus bovino</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Melegrivirus A</i>
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus humano</i> <i>Vírus Ljungan</i>
<i>Salivirus</i>	<i>Salivirus A</i>
<i>Sapelovirus</i>	<i>Sapelovirus aviária</i> <i>Sapelovirus suíno</i> <i>Sapelovirus símio</i>
<i>Senecavirus</i>	<i>Vírus Seneca Valley</i>
<i>Teschovirus</i>	<i>Teschovirus suíno</i>
<i>Tremovirus</i>	<i>Vírus da encefalomielite aviária</i>

Fonte: Adaptado do site do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (disponível em: www.ictvonline.org)

ANEXO B – Resultados quantitativos relacionados ao peso dos animais e à produção de citocinas, NO e ROS em camundongos do grupo controle e do grupo infectado com o vírus Juruaçá, inoculados por via i. n.

Vírus	Eventos		Tempo de sobrevida pós-inoculação (em dias) relacionados à intensidade dos eventos		
			4°	8°	12°
Juruaçá	Peso dos animais	Controle	5,51 g	8,19 g (*)	10,67 g (***)
		Infectado	3,73 g	5,03 g	3,14 g
	IL-12p ₄₀	Controle	61,07 pg/mL	76,29 pg/mL	106,91 pg/mL
		Infectado	63,24 pg/mL	604,42 pg/mL (***)	366,98 pg/mL (***)
	IL-6	Controle	10,01 pg/mL	14,13 pg/mL	17,57 pg/mL
		Infectado	32,68 pg/mL	174,85 pg/mL (***)	55,44 pg/mL (**)
	TNF- α	Controle	5,63 pg/mL	8,33 pg/mL	7,47 pg/mL
		Infectado	3,25 pg/mL	34,57 pg/mL (**)	117,48 pg/mL (***)
	IFN- γ	Controle	0,67 pg/mL	0,88 pg/mL	0,55 pg/mL
		Infectado	2,61 pg/mL	5,11 pg/mL (*)	6,27 pg/mL (**)
	IL-1 β	Controle	13,28 pg/mL	6,67 pg/mL	16,57 pg/mL
		Infectado	18,22 pg/mL	155,29 pg/mL (**)	5,55 pg/mL
	IL-4	Controle	73,69 pg/mL	65,57 pg/mL	57,64 pg/mL
		Infectado	63,14 pg/mL	57,79 pg/mL	43,24 pg/mL
	IL-10	Controle	68,92 pg/mL	57,92 pg/mL	48,76 pg/mL
		Infectado	73,49 pg/mL	52,01 pg/mL	15,79 pg/mL (*)
	NO	Controle	39,82 μ M	62,45 μ M	89,02 μM (***)
		Infectado	26,40 μ M	55,07 μ M	54,07 μ M
	ROS	Controle	2,27	1,07	0,57
		Infectado	18,74 (***)	13,72 (***)	10,56 (**)

Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, onde (***) = $p < 0,001$; (**) = $p < 0,01$; e (*) = $p < 0,05$.

ANEXO C – Documento de aprovação do CEUA

CEUA



Protocolo nº 06/2012

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo com Reg. nº 0022/2012/CEUA/IEC/CENP/SVS/MS, intitulado “**Aspectos da resposta imune do sistema nervoso central de camundongos na infecção experimental pelo vírus Juruaçã, *in vitro* e *in vivo***”, sob a responsabilidade do pesquisador **José Antonio Picanço Diniz Junior**, está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal- CONCEA/MCT e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas-CEUA/IEC/CENP, no dia 13 de novembro de 2012.

Ananindeua-PA, 20 de novembro de 2012.

Claudenilda Rodrigues Paixão
Secretária da CEUA/IEC/CENP/SVS/MS

Paulo Henrique Gomes de Castro
Coordenador Substituto da CEUA/IEC/CENP/SVS/MS