

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PARTICIPAÇÃO DA GLIAS NAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS  
DO CÉREBRO E NA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -QUIMIOCINAS NA  
ENCEFALITE EXPERIMENTAL PELO VÍRUS DA ESTOMATITE  
VESICULAR EM CAMUNDONGOS**

Autor: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos  
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias -  
UNESP, Campus de Jaboticabal, como  
parte das exigências para a obtenção do  
Título de DOUTOR em Medicina  
Veterinária - Área de Concentração em  
Patologia Animal.

JABOTICABAL  
Estado de São Paulo - Brasil  
2003

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

*Rosemeri de Oliveira Vasconcelos*, nasceu em 10 de setembro de 1967, no município de Santa Maria, RS. Filha de Dario Vasconcelos e Regina Maria de Oliveira Vasconcelos. Graduada em Medicina Veterinária, em janeiro de 1990, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. Mestrado em Medicina Veterinária, na Área de Patologia Veterinária, na UFSM, em 02 de abril de 1996. Professora Assistente da disciplina de Anatomia Patológica Especial Veterinária, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), no Curso de Medicina Veterinária, desde 25 de janeiro de 1995.

*Existem dois tipos de sabedoria,  
a inferior, que é dada pelo quanto uma pessoa acha que sabe.  
E a superior, que é dada pelo quanto ela tem consciência  
de que não sabe. (Augusto Cury)*

## AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi pela orientação, confiança, amizade e por apresentar-me o complexo e fascinante mundo da neuropatologia.

Prof. Dr. João Santana da Silva, Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, pelas valiosas sugestões, por gentilmente ceder a linhagem *C57BL/6 IL-4/-* (B6, “Knockout” para IL-4) e *C57BL/6* (B6). Principalmente pela generosidade de colocar seu laboratório a nossa disposição.

Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado, da UNESP-FOA, Câmpus de Araçatuba, pela sugestão do tema deste trabalho, por gentilmente ceder o anticorpo para microglia e para o vírus e pela amizade e pelo companheirismo.

Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto da UNESP-FCAV, por gentilmente ceder a amostra do vírus da estomatite vesicular, sorotipo Indiana II.

Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado (UNESP-FCAV) que ensinou-me que em pesquisa o conhecimento não nos pertence, mas sim àqueles que nos pedem orientação. Obrigada por sua imensa generosidade e por tudo que me ensinou.

Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso, da UNESP – FOA, Câmpus de Araçatuba, pela amizade e incentivo e por gentilmente fazer a titulação do vírus.

Dra. Maristela Pituco, do Instituto Biológico de São Paulo, por gentilmente ceder a amostra de células BHK, para a titulação do vírus.

Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara e o Dr. Mathias Szabó, do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV), por gentilmente cederem o programa de análise de imagens Image Pró-Plus, para a medida do diâmetro astrocitário.

Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira pela proeza de ensinar-me estatística e pelas sugestões na análise deste trabalho.

Prof. Dr. Danísio Prado Munari, Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela valiosa ajuda na tabulação dos dados e nas análises estatísticas.

Aos pós-graduandos Gustavo Garlet e Karen Cavassani, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da FMRP-USP, por sua imensa boa vontade e gentileza em nos auxiliar na imunoistoquímica das quimiocinas e na cultura de células.

Maria Inês Yamazaki Campos (Lia) e Francisca de Assis Ardisson (Chica), FCAV-UNESP, Depto. Patologia Veterinária, pela amizade e companheirismo e pela confecção histológica dos cérebros desta tese.

Luciana Jardim, companheira desses quatro anos, muito obrigada pela amizade e pelo apoio, sem o qual não seria possível completar esse trabalho.

Karen Regina Lemos, obrigada pela amizade sincera, pelos conselhos e por todas as sugestões para melhorar essa tese, principalmente na imunoistoquímica.

Aos colegas de pós-graduação Mary Suzan Varaschin, Gisele Maria de Andrade, Lúcia Padilha Aquino, Gláucia Elaine de Oliveira, Luciana Mukai Andréia Bauer e Márcio Botelho de Castro, pela amizade e o companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV) Moema Makiko Ogassavara, João Domingos, Izaura de Jesus Malerba, Narciso Batista Tel, Edgar Homem, Ronaldo Eduardo Martins Delvechio, Rosangela Yamazaki Andrade (Toti), Marcos Valério Garcia e Avelino Jacinto de Souza Filho, pela ótima convivência.

Sr. Antonio José dos Santos e Sra. Aparecida Rodrigues Batista pela amizade e pelo auxílio na esterilização do material laboratorial.

A bibliotecária Ana Silvia Pamplona Mariano (FCAV – UNESP), pela correção das referências bibliográficas desta tese.

Ao Chefe do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, da UNESP-Câmpus de Araçatuba (DCRRA), Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, pela amizade, compreensão e apoio.

A minha irmã de coração Marcia Marinho, por sempre estar presente em todos os momentos e por sua hospitalidade em sua casa, com seus adoráveis gatinhos.

A Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto e Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado pela valiosa ajuda nas aulas da graduação de Araçatuba neste último ano.

Profa. Dra. Valéria Marçal Félix de Lima pela amizade, hospitalidade e por suas excelentes sugestões imunológicas para este trabalho.

As secretárias do DCCRA (UNESP – Araçatuba), Elza Regina Branco e Claudete Leme por seu constante profissionalismo e principalmente pela amizade.

## SUMÁRIO

|                                                                             | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO.....                                                                 | xx     |
| ABSTRACT.....                                                               | xxii   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                          | 01     |
| 1.1 Objetivos.....                                                          | 03     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                               | 04     |
| 2.1 Sistema nervoso e a resposta imune.....                                 | 04     |
| 2.1.1 Quimiocinas e o Sistema Nervoso Central.....                          | 07     |
| 2.2 Células da Glia x Sistema Imunológico.....                              | 12     |
| 2.2.1 Citocinas e as Células da Glia.....                                   | 12     |
| 2.2.2 Quimiocinas e as Células da Glia.....                                 | 14     |
| 2.2.2.1 Astrócitos.....                                                     | 15     |
| 2.2.2.2 Microglia.....                                                      | 17     |
| 2.3 Mecanismos de evasão viral .....                                        | 21     |
| 2.4 Encefalite Experimental pelo Vírus da Estomatite Vesicular .....        | 24     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                  | 28     |
| 3.1 Animais experimentais .....                                             | 28     |
| 3.2 Vírus da estomatite vesicular (VEV) .....                               | 28     |
| 3.2.1 Preparação das amostras virais.....                                   | 28     |
| 3.2.2 Titulação viral.....                                                  | 29     |
| 3.3 Delineamento experimental.....                                          | 30     |
| 3.3.1 Grupos experimentais.....                                             | 30     |
| 3.3.2 Colheita e preparo do material para o processamento histológico ..... | 31     |
| 3.3.3 Análise em microscopia de luz.....                                    | 34     |
| 3.3.4 Técnica de imunoistoquímica.....                                      | 34     |
| 3.3.5 Densidade celular e morfometria astrocitária.....                     | 37     |
| 3.3.7 Análise estatística.....                                              | 38     |
| 4. RESULTADOS.....                                                          | 40     |
| 4.1 Sinais clínicos.....                                                    | 40     |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 Análise em microscopia de luz.....                                      | 40 |
| 4.2.1 Histopatologia.....                                                   | 40 |
| 4.2.2 Imunoistoquímica.....                                                 | 45 |
| 4.2.2.1 Imunomarcacão para o VEV.....                                       | 45 |
| 4.2.2.2 Imunomarcacão para astrócitos.....                                  | 46 |
| 4.2.2.3 Imunomarcacão para as $\beta$ -quimiocinas.....                     | 52 |
| 4.2.2.4 Imunomarcacão para a microglia.....                                 | 53 |
| 4.3 Densidade Celular e Morfometria .....                                   | 55 |
| 4.3.1 Diâmetro de Astrócitos.....                                           | 55 |
| 4.3.2 Densidade de Astrócitos.....                                          | 57 |
| 4.3.3 Densidade de células positivas para a Quimiocina MIP-1 $\alpha$ ..... | 58 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                          | 62 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                         | 78 |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                                         | 79 |
| ANEXOS .....                                                                | 88 |

## LISTA DE TABELAS

| Tabela                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Expressão de receptores de quimiocinas em diferentes tipos celulares e seus respectivos ligantes.....                                                                                                                                                                                                                                         | 10     |
| 2 Delineamento experimental dos grupos de camundongos do modelo de encefalite por VEV.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 30     |
| 3 Anticorpos utilizados para a imunomarcacão dos cérebros dos camundongos do modelo experimental de encefalite pelo VEV...                                                                                                                                                                                                                      | 35     |
| 4 Principais procedimentos da imunomarcacão dos cérebros processados para congelacão.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 36     |
| 5 Principais procedimentos da imunomarcacão de cérebros incluídos em parafina.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 37     |
| 6 Distribuicão e intensidade das lesões microscópicas na encefalite por VEV, nos diferentes grupos e áreas.....                                                                                                                                                                                                                                 | 44     |
| 7 Intensidade da reacão positiva para as imunoistoquímicas testadas na encefalite experimental pelo vírus da estomatite vesicular, dentro dos grupos experimentais.....                                                                                                                                                                         | 54     |
| 8 Resumo da análise de variância para o diâmetro de astrócitos, considerando os efeitos de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interacão entre grupo e área.....                                                                                                       | 56     |
| 9 Médias estimadas e respectivos erros-padrão para o diâmetro de astrócitos por grupo (3 a 5) em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interacão entre grupo e área..... | 56     |
| 10 Resumo da análise de variância para a raiz quadrada da densidade de astrócitos, considerando os efeitos de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo,                                                                                                                                                          |        |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 58 |
| 11 | Médias estimadas e respectivos erros-padrão para a densidade de astrócitos por grupo (3 a 5) em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área..... | 59 |
| 12 | Resumo da análise de variância para a raiz quadrada da densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , considerando o efeito de grupo (3 a 5) e de animal dentro de grupo.....                                                                                                                                               | 60 |
| 13 | Médias gerais estimadas e respectivos erros-padrão por grupo (3 a 5) para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , a partir do modelo matemático proposto, que incluiu os efeitos fixos de grupo e de animal dentro de grupo.....                                                                                   | 61 |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 Plano de corte horizontal do cérebro de camundongo, utilizado no modelo de encefalite por VEV, para as imunoistoquímicas de quimiocinas e microglia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 32     |
| 2 Desenho esquemático de um plano de corte transversal do cérebro de camundongo, utilizado no modelo de encefalite por VEV. As letras correspondem as seguintes áreas: (A) Bulbo Olfatório; (B) Fissura Rinal; (C) Quiasma Óptico; (D) Infundíbulo Hipofisário; (E) Ponte (modificado de MACHADO, 1999).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 33     |
| 3 Fotomicrografias de cérebros de camundongos infectados pelo VEV. (A) Necrose neuronal (setas) em bulbo olfatório (BO) de G1; (B) Gliose (cabeça de seta vermelha) em córtex (CO) com necrose (seta), G1; (C) Necrose neuronal (setas) no hipocampo (HIP), G3; (D) Tálamo (TA) com necrose (setas), G7; (E) Necrose neuronal (setas) no tronco cerebral (TR), G7; (F) Ventriculite (seta) (Ventrículo Lateral - VL) em G1. Técnica de Hematoxilina & Eosina. Barra = 25µm.....                                                                                                                                                                                                       | 48     |
| 4 Fotomicrografias da seqüência de lesões microscópicas no cérebro de camundongos inoculados com VEV, em H & E e Imunoistoquímica (IH). (A) Necrose neuronal (setas) do hipocampo (HIP) – (G3 / H&E); (B) Necrose (seta) hipocampal HIP) com lesão astrocitária (cabeça de seta azul) – (G3 / IH GFAP); (C) Necrose (cabeças de seta azul) hipocampal (HIP) com neurônios positivos (setas) para VEV (G3 / IH VEV); (D) Tronco cerebral (TR) com presença do vírus (setas) – (G7 / IH VEV); (E) Bulbo Olfatório (BO) com astrócitos íntegros (G1 / IH GFAP); (F) Bulbo Olfatório (BO) com foco necrótico (N) e astrocitose reativa na periferia (seta) (G6 / GFAP). Barra = 25µm..... | 49     |

- 5 Fotomicrografias de lesões sequenciais em camundongos com encefalite por VEV. (A) Tálamo (TA) com manguitos perivasculares (seta azul) e debris celulares (seta) – (G6 / H&E) ; (B) Mesma lesão de A, com presença do vírus (seta azul) associado aos debris celulares (seta) – (G6 / IH VEV); (C) Lesão similar a A e B, com presença da microglia (setas) – (G6 / IH OX-42); (D) Bulbo (BO) com necrose (N) com microglia fagocítica (setas) – (G3 / IH OX-42); (E) Microglia bipolar (seta) no tronco cerebral (TR); (F) Microglia ramificada (seta) no córtex (CO); (G) Microglia fagocítica (setas) no Tálamo (TA) – (E-G / IH OX-42, G6); Barra = 25 $\mu$ m..... 50
- 6 Fotomicrografias da imunomarcação para MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  na encefalite murina por VEV. (A) Tronco Cerebral (TR) com células positivas para MIP-1 $\alpha$  (G3); (B) Tronco cerebral (TR) com neurônios positivos (seta branca) e astrócitos (seta) – (G6); (C) Células positivas para MIP-1 $\alpha$  (seta) no infiltrado do bulbo olfatório (BO); (D) Células MIP-1 $\alpha$  positivas (seta), semelhantes a microglia, no cerebelo (CB) – (G7); (E) Bulbo olfatório (BO) com necrose (N) e células MIP-1 $\beta$  positivas (setas) na periferia (G7); (F) Corpo Caloso (CC) com células fusiformes (microglia) positivas (setas) para MIP-1 $\beta$  (G7). Barra = 25 $\mu$ m..... 51
- 7 Médias estimadas do diâmetro de astrócitos (*mm*) por grupo (3 a 5) em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área... 57

- 8 Médias estimadas de densidade de astrócitos por grupo (3 a 5), em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área... 59
- 9 Médias gerais estimadas por grupo (3 a 5) para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , a partir do modelo matemático proposto, que incluiu os efeitos fixos de grupo e de animal dentro de grupo..... 61

## LISTA DE ANEXOS

| Tabela                                                                                                                                                                                                                      | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1A Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por grupo (1 a 7), para o diâmetro de astrócitos.....                                                                                | 89     |
| 2A Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para o diâmetro de astrócitos.....        | 89     |
| 3A Médias gerais observadas e número de informações (n), por grupo (1 a 7) em cada área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para o diâmetro de astrócitos.....                | 90     |
| 4A Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por grupo (1 a 7), para a densidade de astrócitos.....                                                                               | 90     |
| 5A Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para a densidade de astrócitos.....       | 91     |
| 6A Médias gerais observadas e número de informações, entre parênteses, por grupo (1 a 7) em cada área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para a densidade de astrócitos..... | 91     |
| 7A Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por grupo (1 a 7), para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ .....                                      | 92     |

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHE – Barreira Hemato-encefálica  
CD4 – Co-receptor do Linfócito T auxiliar  
CD8 – Co-receptor do Linfócito T citotóxico  
CCR1 a 5 – Receptores para as  $\beta$ -Quimiocinas  
CsFs – Fatores de Crescimento  
CXCR1, 2, 3, 4 – Receptores 1, 2, 3, 4 para as  $\alpha$ -quimiocinas  
GFAP – Proteína glial fibrilar ácida  
GRO- $\alpha$  - Oncogene  $\alpha$  relacionado ao crescimento ( $\alpha$ -quimiocina)  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
IFN- $\alpha/\beta$  - Interferon alfa / beta  
KNOCKOUT – camundongos depletados geneticamente para algum gene  
IL-1 $\beta$  - Interleucina – 1 beta  
IL-2 – Interleucina - 2  
IL-4 – Interleucina – 4  
IL-5 – Interleucina - 5  
IL-6 – Interleucina - 6  
IL-8 – Interleucina – 8 ( $\alpha$ -quimiocina)  
IL-10 – Interleucina – 10  
IL-12 – Interleucina – 12  
IP-10 – Proteína 10 induzida por Interferon- $\gamma$  ( $\alpha$ -quimiocina)  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MCP-1,2,3 – Proteína quimioatraente de monócitos 1, 2, 3 ( $\beta$ -quimiocinas)  
MEM – Meio essencial mínimo  
MIG – Monocina induzida por Interferon- $\gamma$  ( $\alpha$ -quimiocina)  
MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal  
MIP-1 $\alpha$  - Proteína Inflamatória de Macrófagos – 1 alfa  
MIP-1 $\beta$  - Proteína Inflamatória de Macrófagos – 1 beta

Rantes – Secretada, expressa e regulada sob ativação de linfócitos T normais

RT-PCR – Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase – Transcriptase Reversa

SCF-1 – Fator 1 derivado de células estromais

SNC – Sistema Nervoso Central

TCID<sub>50</sub> – Dose Infectante que causa dano em 50% da cultura de células

TGF- $\beta$  - Fator beta transformador do crescimento

Th1 – Linfócitos T auxiliares 1

Th2 – Linfócitos T auxiliares 2

VEV – Vírus da Estomatite Vesicular

# **PARTICIPAÇÃO DA GLIA NAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO CÉREBRO E NA PRODUÇÃO DE b-QUIMIOCINAS NA ENCEFALITE EXPERIMENTAL PELO VÍRUS DA ESTOMATITE VESICULAR EM CAMUNDONGOS**

## **RESUMO**

A compreensão do comportamento da microglia frente a uma injúria viral contribui para o entendimento da dimensão da rede de comunicação celular, durante um processo degenerativo ou inflamatório no SNC. Pesquisas que utilizam modelos experimentais com o vírus da estomatite vesicular (VEV) têm colaborado com informações importantes sobre o comportamento e distribuição do agente no encéfalo, e também sobre o papel da resposta imune na resolução ou no agravamento das lesões nervosas. Neste estudo, foi comparada a evolução do quadro neurológico induzido pelo VEV, por meio de técnicas de imunoistoquímica, em cérebros de camundongos. Foi possível observar que o VEV causa severa degeneração e necrose do neurópilo, com lesão direta em neurônios, pois estes mostraram-se claramente positivos para o vírus, por meio da reação de imunoistoquímica no cérebro. A reação astrocitária foi intensa nos animais infectados, porém a densidade destas células reduziu com o aumento da gravidade das lesões. As células residentes (neurônios, astrócitos e microglia) e as células inflamatórias expressaram MIP-1 $\alpha$  e, em menor proporção, MIP-1 $\beta$ . A microgliose reativa foi significativa nos animais com sintomatologia clínica. A diversidade morfológica da microglia foi grande, variando desde uma forma fusiforme a uma ramificada e a forma arredondada fagocítica das áreas necróticas. Foi possível observar que existe uma profunda interação entre as células residentes do SNC - neurônios, microglia, astrócitos, endotélio, frente ao estímulo viral. Baseado nos relatos da literatura é importante salientar que os astrócitos mantêm um controle ativo sobre a microglia tanto em repouso quanto ativada, via citocinas/quimiocinas. A densidade aumentada

dessas células coincidiu com a redução do número de astrócitos, devido à necrose do neurópilo. Talvez este fato seja o responsável pelo agravamento das lesões do neurópilo nos animais que tiveram maior tempo de infecção. Possivelmente, as quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  não sejam essenciais nesta fase da neurinfecção.

**Palavras-chave:** astrócitos, microglia, quimiocinas, citocinas, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , vírus da estomatite vesicular, encefalite viral, neuropatologia.

## **GLIAL PARTICIPATION IN THE MORPHOLOGICAL ALTERATIONS OF THE BRAIN AND $\beta$ -CHEMOKINES PRODUCTION IN THE EXPERIMENTAL ENCEPHALITIS BY THE VESICULAR STOMATITIS VIRUS IN MICE**

### **ABSTRACT**

The comprehension of the microglial cell behavior in a viral injury collaborate for the understanding of the dimension of the cellular communication net, during a degenerative or inflammatory process in central nervous system (CNS). Experimental models with the vesicular stomatitis virus (VSV), has contributed with important information about the behavior and distribution of virus in the CNS. Such studies evaluated the role of the immune response in the resolution or in the damage of the nervous lesions. In this study, the evolution of the neurological signals and lesions induced by VSV infection in mice was studied, using imunohistochemical techniques. It was observed that VSV causes severe degeneration and necrosis of the neuropil and direct lesions to the neurons. The neurons were the most intensively stained cells for the virus in the brain. The reactive astrocytosis was intense in the infected animals, but the density of these cells reduced with the increase of the gravity of the lesions. The resident and inflammatory cells expressed MIP-1 $\alpha$  and in smaller proportion MIP-1 $\beta$ , in different cellular types (neurons, astrocytes and microglia). The reactive microgliosis was significant in animals with clinical symptomatology and there was a great morphologic microglial diversity, varying from a fusiforme form and ramified form and the fagocitic round form of the around necrotics areas. It was possible to observe that a close interaction exists among the resident cells of SNC (neurons, microglia, astrocytes, endothelial cells) in face of the viral infection. Based on the reports of the literature it is important to point out that the astrocytes maintains an active control on the microglia (in resting or activated cells), through cytokines/chemokines. The increased density of microglia coincided with the reduction of the astrocytes number, due to the necrosis of the

neuropil. Perhaps this fact is the cause for the lesions of the neuropil in the animals that had prolonged time of infection. Possibly the chemokines MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  have not important role in this phase of the neuroinfection.

**Key-Words:** astrocytes, microglia, chemokines, cytokines, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , vesicular stomatitis virus, encephalitis viral, neuropathology.

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imune possui muitos tipos celulares que secretam uma variedade de proteínas que regulam e sinalizam a resposta entre as células. Essas proteínas são denominadas citocinas, capazes de se conjugar a receptores celulares, com efeito local ou sistêmico. Podem induzir a divisão, a diferenciação e a produção de novos receptores ou de produtos protéicos. As citocinas atuam sobre vários tipos de células ou diferentes citocinas podem ter efeito semelhante sobre estas células. As principais citocinas descritas são as interleucinas (IL), os interferons (IFN), os fatores de necrose tumoral (TNF) e as quimiocinas. Essas interferem na ação dos leucócitos e dos agentes virais. Podem estimular o crescimento de células e induzir à morte celular programada (apoptose) em tumores (TIZARD, 1998).

As quimiocinas são um grupo numeroso e crescente de citocinas, com funções diversas, tais como a atividade quimiotática e o estímulo funcional sobre várias células inflamatórias (MARTINEZ & PANDO, 1999). São essenciais na manutenção do equilíbrio dos sistemas do organismo, inclusive durante a fase de desenvolvimento dos tecidos. Estas proteínas também participam da geração das respostas imune inata e adaptativa (LUSSO, 2000). A possibilidade de controlar a ação das quimiocinas, abre um caminho potencialmente importante nas terapias das enfermidades inflamatórias, principalmente no Sistema Nervoso Central (SNC) (MARTINEZ & PANDO, 1999).

As primeiras teorias sobre a neuroglia surgiram a partir de um conceito histórico em que as células gliais eram um tecido conjuntivo, que existia para auxiliar as verdadeiras células funcionais do encéfalo, os neurônios. Virchow, em 1846, denominou a neuroglia como uma substância conjuntiva, formada na medula espinhal e no cérebro, na qual os elementos do SNC estavam embebidos. No início do século 20, por meio de técnicas histoquímicas, foi possível determinar quais eram os componentes da neuroglia. O primeiro elemento descrito foi o neurônio, posteriormente foram identificados os astrócitos e por último foi descoberto um terceiro elemento, que compreendia a

microglia e os oligodendrócitos. Atualmente, comprovou-se que todos estes componentes da neuroglia, estão intensamente envolvidos na manutenção do equilíbrio fisiológico no neurópilo ou na modulação de uma resposta imune frente a agentes injuriantes. Esta modulação da resposta é feita por sinalização entre as células gliais e/ou pela interação com o endotélio e com leucócitos infiltrantes, para a produção de uma cascata de sinais químicos que irão direcionar a resposta (KETTENMANN & RANSON, 1995).

Em neuropatologia humana existem muitos estudos sobre os efeitos das citocinas sobre o tecido nervoso em doenças autoimunes, degenerativas, bacterianas e virais. É o caso da Esclerose Múltipla (MS), da Doença de Alzheimer, do Complexo Demência - AIDS e de meningites bacterianas. As conseqüências da liberação dessas citocinas e da destruição do neurópilo, em decorrência da resposta imune, têm estimulado muitas pesquisas na busca de uma terapia eficiente para a inibição ou para a redução desses danos (MERRIL & BENVENISTE, 1996).

Os linfócitos T e os macrófagos são células que contribuem para a resposta imune, porém podem estar envolvidos na patogenia de doenças do sistema nervoso. Isso pode ser visto em vários modelos de neuropatias virais (LIU & LANE, 2001).

As viroses têm estabelecido uma relação com seus hospedeiros naturais, que oscila entre a agressividade e o respeito. A rápida extinção do hospedeiro não é uma estratégia ideal de sobrevivência para os vírus. Certos agentes virais são capazes de mimetizar proteínas celulares, inclusive do sistema imune. Muitas pesquisas estão sendo feitas, para elucidar esses mecanismos de evasão viral imune. São feitas tentativas de explorar essas estratégias de produção de antiqüimocinas virais, para a terapia de doenças inflamatórias (LUSSO, 2000).

A utilização do vírus da estomatite vesicular (VEV), como modelo experimental, para o estudo de infecções virais no SNC, tem trazido informações importantes para a compreensão do comportamento e distribuição do agente no encéfalo. Também foram feitos alguns estudos sobre o papel da

resposta imune na resolução ou no agravamento das lesões nervosas (MACHADO, 1999, FEDERICI, 2000, MAZZUCATTO, 2000).

As pesquisas mais recentes, demonstram a importância das quimiocinas na resposta a agentes virais, principalmente para o HIV. Além da quimiotaxia sobre leucócitos, estas citocinas especializadas também podem exercer efeitos inibitórios sobre a replicação viral. Isso foi visto com MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes na AIDS (LAVI et al., 1998, LUSSO, 2000). O estudo destas quimiocinas associado a um modelo viral, que leva a encefalite aguda como o VEV, é primordial para a compreensão dos processos neurodegenerativo e inflamatório das encefalites virais. Para completar essa interação, deve-se incluir as células da glia, que possuem um comportamento fundamental na manutenção da homeostase cerebral, mas quando ativadas são essenciais na modulação da resposta imune.

A escolha das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , neste estudo, foi baseada nos relatos de literatura sobre o envolvimento de ambas nos processos infecciosos virais do cérebro.

A importância das pesquisas com o modelo de encefalite viral é proporcionar subsídios para o entendimento, entre outros aspectos, do comportamento da microglia ativada, em resposta a processos infecciosos. A capacidade funcional destas células está sendo estudada também em muitas doenças neurodegenerativas. Algumas pesquisas ressaltam os efeitos neurotóxicos das citocinas derivadas da microglia, principalmente associados ao óxido nítrico e outros derivados citotóxicos. Os neurônios parecem ser as células mais sensíveis a este efeito. É importante verificar a relação da microglia, com os processos degenerativos e inflamatórios, descritos na encefalite por VEV. Ainda não foi feito um estudo que relacione esta célula glial com as lesões e com a presença do vírus, no local da injúria ao Sistema Nervoso.

## **1.1 OBJETIVOS**

Neste estudo teve-se por objetivos verificar:

- A variação morfológica da microglia de camundongos frente a uma infecção viral experimental pelo VEV;
- A resposta proliferativa da microglia e dos astrócitos ativados, em um quadro de encefalite em camundongos infectados pelo VEV;
- Observar a presença das  $\beta$ -quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , nas células residentes do SNC, em camundongos controle e infectados pelo VEV, neste modelo de encefalite viral.
- Comparar a intensidade das lesões ao neurópilo entre as linhagens de camundongos Swiss e B6 (C57BL/6 “Knockout” para IL-4 e C57BL/6 não depletado), inoculados com o VEV.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Sistema nervoso e a resposta imune**

O SNC até há alguns anos, era considerado um sítio imunologicamente privilegiado. Era pouco eficiente em participar da resposta imune ou em excluir componentes do sistema imunológico, devido a barreira hematoencefálica (BHE). Em estudos recentes, foi observado que em doenças virais, na Esclerose Múltipla humana ou na Encefalite Alérgica Experimental (EAE) em modelos animais, ocorrem importantes processos imunológicos dentro do SNC (FABRY et al., 1994, MERRILL & BENVENISTE, 1996). A ausência de drenagem linfática no SNC foi reformulada, pois existem pesquisas em que concluiu-se uma conexão entre o tecido nervoso e os linfonodos da região cervical profunda. Estes linfonodos fariam a drenagem local, favorecendo o processo de apresentação periférica de antígenos do tecido nervoso (FABRY et al., 1994).

O SNC possui tipos celulares específicos, que participam da resposta imune ou interagem com o sistema imune (FABRY et al., 1994). Algumas células endógenas do cérebro (astrócitos, endotélio e microglia) e os leucócitos (macrófagos, linfócitos T) atuam no processo inflamatório, pela liberação de fatores solúveis ou pelo contato entre as células (XIAO & LINK, 1998).

A BHE é relativamente impermeável para proteínas, íons, peptídeos e aminoácidos. Isso ocorre pelas junções oclusivas entre as células endoteliais, a membrana basal vascular, as células musculares lisas / pericitos e os processos terminais de astrócitos (FABRY et al., 1994, MERRILL & BENVENISTE, 1996). A passagem fisiológica de linfócitos dentro do neurópilo é reduzida pela barreira física dos vasos sanguíneos (XIAO & LINK, 1998). A BHE influencia a ativação de linfócitos T, tanto pela apresentação de antígenos como pela expressão de moléculas de adesão, que estimulam estas células (FABRY et al., 1994). A BHE também facilita a adesão e a penetração de células imunes circulantes e ativadas (XIAO & LINK, 1998).

Os linfócitos T necessitam de uma combinação de sinais, que desencadeia um fenótipo migratório e favorece a penetração destas células através da BHE (XIAO & LINK, 1998). A expressão de receptores por células da glia, endotélio e leucócitos, estabelece um gradiente atrativo no neurópilo. Estes receptores favorecem a difusão dos linfócitos pelo tecido nervoso. A expressão destes receptores é induzida por citocinas (MERRILL & BENVENISTE, 1996).

Sob condições patológicas, moléculas de MHC (complexo maior de histocompatibilidade) são expressas pelas células endoteliais, microglia, astrócitos e pericitos do SNC (FABRY et al., 1994). Os astrócitos e a microglia ativados, além do MHC, também expressam moléculas de adesão, liberam intermediários do oxigênio e produzem citocinas (XIAO & LINK, 1998).

Na Encefalomielite Experimental Alérgica (EAE), o perfil de citocinas que predomina em linfócitos T reativos à mielina é do tipo Th1 (pró-inflamatórias). Têm sido observado que IL-4 pode ter um efeito protetor, pois camundongos deficientes em IL-4 mostram sinais clínicos mais severos e lesões mais extensas no cérebro e na medula espinhal, associados a um aumento substancial na expressão das citocinas pró-inflamatórias (FALCONE et al., 1998). Outros pesquisadores testaram o efeito neuroprotetor das citocinas Th2, no modelo de Esclerose Múltipla. Eles observaram que IL-10 promoveu a supressão dos sinais clínicos e das alterações histológicas. Por este fato, sugeriram que os efeitos

degenerativos que ocorrem em doenças autoimunes, são mediados por linfócitos Th1 (BETTELLI et al., 1998, STOHLMAN et al., 1999).

O reconhecimento de antígenos virais, por linfócitos T, é feito após o processamento de fragmentos proteolíticos do antígeno, que são apresentados à superfície celular pelo MHC (classes I e II). Cada tipo de apresentação é reconhecida por linfócitos T CD8<sup>+</sup> (MHC classe I) e por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (MHC classe II). Os primeiros são altamente citolíticos. Os CD4<sup>+</sup> produzem citocinas para a síntese de anticorpos e para a proliferação dos CD8<sup>+</sup>. As vias de processamento antigênico são diferentes, ou seja, podem ser citosólica (MHC classe I) ou endossomal (MHC classe II). Os antígenos presentes externamente às células são processados pela via endossomal, já os intracelulares usam a via citosólica. Após a infecção da célula, os vírus controlam a síntese protéica e a apresentação antigênica será citosólica. Com a síntese endógena das proteínas virais, o vírus sai da célula e dessa forma pode ser processado pela via endossomal. Tem sido sugerido que os linfócitos CD8<sup>+</sup> seriam importantes no controle antiviral, já que as moléculas do MHC classe I são expressas em quase todas as células. As moléculas da classe II (CD4<sup>+</sup>) são expressas constitutivamente apenas em linfócitos B e em células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos B são incapazes de fagocitar, mas são excelentes apresentadores de antígenos solúveis, pois a molécula do anticorpo serve como um receptor específico para a captura e internalização do antígeno. Existem crescentes evidências de que citocinas liberadas no local por linfócitos T, contribuiriam para a eliminação do vírus, por efeito antiviral direto ou por ação indireta de células efectoras. Os clones de linfócitos T murinos podem sintetizar citocinas do fenótipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). A citocina IFN- $\gamma$  tem um eficiente efeito antiviral. Ela regula a expressão de MHC classe II e com isso há um aumento da apresentação antigênica, juntamente com a indução de um estado antiviral nas células adjacentes à infecção (KOSZINOWSKI et al., 1991).

### 2.1.1 Quimiocinas e o Sistema Nervoso Central

As quimiocinas constituem uma crescente família de mensageiros intercelulares, os quais tem grande importância no desenvolvimento e homeostase de vários órgãos sistêmicos, particularmente o sistema hematopoiético (LUSSO, 2000). São consideradas peptídeos de baixo peso molecular (8-14kDa), estrutural e funcionalmente relacionadas e codificadas por genes localizados nos cromossomos 4 e 17 (MARTINEZ & PANDO, 1999). São consideradas uma nova classe de pequenas citocinas, que estão relacionadas com a atração de leucócitos e com o aumento da interação entre estas células e o endotélio. Podem ter efeitos seletivos sobre subpopulações de leucócitos (GLABINSKI et al., 1995). Fazem o controle fisiológico da recirculação de leucócitos, bem como, são capazes de conter os mesmos nos sítios de dano tecidual (LUSSO, 2000). A atividade destas citocinas especializadas também foi descrita no reparo tecidual e em neoplasias (LAVI et al., 1998) e estão envolvidas na manutenção da homeostase do cérebro maduro e em desenvolvimento. Estimulam a migração, a diferenciação e a proliferação de neurônios e de células gliais. O receptor CXCR4 ( $\alpha$ -quimiocinas) e seu ligante (SCF-1) são vitais para o cerebelo em desenvolvimento, por direcionarem a migração de neurônios (BAJETTO et al., 2001). Também podem estimular uma atividade biológica com a expressão de concentrações mínimas nos tecidos (LAVI et al., 1998). Estas citocinas especializadas possuem sítios de ligação com glicosaminoglicanos e sua terminação carboxil une-se à heparina. Uma vez secretadas, permanecem nos tecidos, tornando-se imobilizadas pela união com os proteoglicanos (superfície celular) ou proteínas da matriz extracelular (MARTINEZ & PANDO, 1999).

As quimiocinas possuem algumas funções importantes relacionadas a resposta imune:

- Migração celular , em que as quimiocinas estimulam a marginação, a adesão e o extravasamento leucocitário dos vasos sanguíneos para os sítios de

injúria. Este estímulo ocorre em combinação com selectinas, integrinas e proteoglicanos expressos pelo endotélio;

- Coestimulação, quando há a ativação celular. Esta função pode amplificar as respostas proliferativas e secretórias (citocinas) dos linfócitos T;
- Efetora, na qual diferentes quimiocinas estimulam a produção de radicais derivados do oxigênio por monócitos (microbicidas). Também há o estímulo da liberação de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos (proteases), basófilos (histamina) e de peptídeos citotóxicos de eosinófilos;
- Polarização, ocorre a influência do padrão de secreção de citocinas da resposta imune (LUSSO, 2000). Os receptores das quimiocinas podem influenciar a polarização da resposta de linfócitos T para um padrão Th1 ou Th2 (LIU & LANE, 2001).

As quimiocinas dividem-se em quatro famílias, baseando-se na sua estrutura: as quimiocinas alfa ( $\alpha$  ou CXC), as quimiocinas beta ( $\beta$  ou CC) (MERRILL & BENVENISTE, 1996, TIZARD, 1998, LUSSO, 2000), as gama-quimiocinas ( $\gamma$  ou C) e as lâmbda-quimiocinas ou CX<sub>3</sub>C ( $\lambda$ ) (MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 1999, LUSSO, 2000). A variação estrutural entre elas deve-se à presença de 92 a 125 amino-ácidos com quatro cisteínas N-terminais conservadas, ligadas por pontes de dissulfeto (LAVI et al., 1998, LUSSO, 2000).

No grupo CXC existem duas cisteínas separadas por um amino-ácido. Na família CC existem duas cisteínas residuais na estrutura das quimiocinas. Nas quimiocinas C e CX<sub>3</sub>C aparecem uma única cisteína residual ou duas cisteínas separadas por três amino-ácidos, respectivamente (LUSSO, 2000, BAJETTO et al., 2001).

As quimiocinas da família CXC são potentes agentes quimiotáticos para neutrófilos. As do grupo CC atuam seletivamente sobre linfócitos T, monócitos e macrófagos (LIU & LANE, 2001). Na subfamília  $\alpha$ , a proteína IL-8 é a mais estudada, sendo produzida por fibroblastos, macrófagos, linfócitos, granulócitos, células endoteliais, hepatócitos e queratinócitos. Estimulam a quimiotaxia, a degranulação, a queima respiratória e a liberação de leucotrienos sobre os neutrófilos, basófilos e linfócitos (TIZARD, 1998). Sua principal função

é influenciar no recrutamento e na ativação de leucócitos para o sítio de inflamação (MERRILL & BENVENISTE, 1996). A  $\alpha$ -quimiocina GRO- $\alpha$  (oncogene  $\alpha$  relacionado ao crescimento) é produzida em astrócitos e neurônios. Ela é uma potente estimuladora da proliferação de oligodendrócitos. Sua expressão em oligodendrócitos induz a infiltração de neutrófilos e a astrogliose (BAJETTO et al., 2001). A expressão da  $\beta$ -quimiocina MIP-1 $\alpha$  também foi verificada em neurônios, no cérebro de pacientes com esquizofrenia (LAVI et al., 1998). As quimiocinas gama (C) e a lâmbda (CX<sub>3</sub>C) são compostas unicamente pelas ligantes linfotactina e pela fractalcina respectivamente (MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 1999).

As quimiocinas, do ponto de vista funcional, foram classificadas em quimiocinas domésticas ou residentes (expressão constitutiva) e as quimiocinas pró-inflamatórias (induzíveis e que participam da resposta imune). A ação destes grupos de proteínas é mediada pelo reconhecimento seletivo e ativação de receptores. Os mesmos pertencem a uma superfamília de receptores pares ligados à proteína G do domínio 7-transmembrana. Quando ativados, os receptores produzem uma cascata de sinais de condução intracelulares (LUSSO, 2000), que resultam no aumento do cálcio intracelular, na produção de citocinas e quimiocinas, na adesão à matriz endotelial e na quimiotaxia (LIU & LANE, 2000). Recentemente, foi proposta uma nova nomenclatura para as quimiocinas. Todas elas recebem a letra L, que corresponde ao ligante e um número que designa a família a qual pertencem. As quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , passaram a chamar-se CCL3 e CCL4 respectivamente (GANGUR et al., 2002).

Os receptores de quimiocinas, baseados em suas ligações (ligantes) específicas, são classificados em três categorias: receptores específicos (um único ligante conhecido), compartilhados (múltiplos ligantes de uma única família de quimiocinas) e os promíscuos (múltiplos ligantes de famílias diferentes). A expressão destes receptores também pode ser constitutiva ou induzível em vários tipos celulares (LUSSO, 2000). Estes receptores são divididos em dois grandes grupos (CXC e CC). As quimiocinas CXC tem alta

afinidade em ligar-se a um único receptor, com exceção de IL-8 que pode ligar-se a CXCR1 e CXCR2. As quimiocinas do grupo CC são capazes de ligar-se a vários receptores. Um resumo da distribuição de alguns receptores e seus respectivos ligantes, é descrito na Tabela 1.

TABELA 1 – Expressão de receptores de quimiocinas em diferentes tipos celulares e seus respectivos ligantes.

| Receptor | Ligante                                         | Células alvo                                                                |
|----------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| CXCR1    | IL-8                                            | neutrófilos, monócitos<br>poucos linfócitos.                                |
| CXCR2    | IL-8                                            | neutrófilos, monócitos<br>poucos linfócitos.                                |
| CXCR3    | IP-10, MIG                                      | Linfócitos T ativados, astrócitos,<br>microglia, epêndima, plexo coróide    |
| CXCR4    | SDF-1                                           | Monócitos, neutrófilos, linfócitos<br>periféricos, astrócitos               |
| CCR1     | MIP-1 $\alpha$ , Rantes, MCP-1<br>MCP-2, MCP-3  | Monócitos, linfócitos T, basófilos,<br>Células exterminadoras, céls. gliais |
| CCR2     | MIP-1 $\alpha$ , Rantes, MCP-1,<br>MCP-2, MCP-3 | Monócitos, linfócitos T, basófilos,<br>Células exterminadoras, céls. gliais |
| CCR3     | eotaxina                                        | eosinófilos                                                                 |
| CCR4     | MIP-1 $\alpha$ ,<br>Rantes                      | Células gliais, neurônios<br>microglia                                      |
| CCR5     | MIP-1 $\alpha$ ,<br>Rantes,<br>MIP-1 $\beta$    | Células gliais, neurônios;<br>Microglia<br>Astrócitos reativos, macrófagos  |

IP-10 – proteína 10 induzida por interferon  $\gamma$ ; MIG – monocina induzida por interferon  $\gamma$ ; SDF-1 – fator 1 derivado de células estromais; MIP-1 $\alpha$  e  $\beta$  - proteína inflamatória de macrófagos; MCP-1,2,3 – proteína quimioatraente de monócitos (LAVI et al., 1998);

A expressão dos receptores de quimiocinas pode estar relacionada ao fenótipo Th1 ou Th2 de linfócitos T auxiliares. Os receptores CXCR3 e CCR5 são expressos em linfócitos Th1. Já CCR3 e CCR4 são seletivamente expressos em linfócitos Th2. Estes receptores podem ser considerados marcadores do subtipo de linfócitos T, comprovando a flexibilidade na expressão dos genes destes receptores (MARTINEZ & PANDO, 1999).

Os receptores de quimiocinas, comprovadamente envolvidos na patogenia da AIDS, são CCR5 e CXCR4 (mais importantes), CCR3 e CCR2b.

Com exceção do último, todos os outros são expressos no SNC e estão envolvidos no Complexo Dementia AIDS. A microglia, célula alvo do HIV, expressa CCR3, CCR5 e em menor proporção CXCR4. Astrócitos expressam CXCR4. Neurônios expressam CXCR4 e CCR3. Todas estas células podem estar envolvidas na fixação da glicoproteína do HIV (gp120) à membrana das células, via receptores (LAVI et al., 1998).

Uma ampla variedade de células produz quimiocinas inflamatórias sobre estímulo bacteriano, viral ou pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O sinal inicial é dado por células residentes teciduais, com posterior amplificação por células apresentadoras de antígenos. Mais tarde podem aparecer linfócitos T citolíticos (CD $_8^+$ ) que produzem quimiocinas imunomodulatórias que controlam infecções virais na fase inicial, pela destruição das células infectadas. Estas células CD $_8^+$  possuem grânulos citolíticos, que são ligados a quimiocinas pré-formadas (Rantes, MIP-1 $\alpha$ ). Sob ativação, estes grânulos são descarregados (LUSSO, 2000). No SNC, em alguns casos, a expressão das quimiocinas é seguida da entrada de leucócitos no parênquima nervoso. Esse fato pode significar que as quimiocinas mais amplificam, do que iniciam a resposta inflamatória de quimiotaxia. Em outras situações, a expressão delas pode preceder a infiltração leucocitária no SNC (BAJETTO et al., 2001).

A quimiocina MIP-1 $\alpha$  tem ação seletiva sobre monócitos e linfócitos, é muito efetiva nos processos virais. Ela é considerada um potente indutor de quimiotaxia para células exterminadoras (NK). Rantes é três vezes mais potente que MIP-1 $\alpha$  no recrutamento destas células (MARTINEZ & PANDO, 1999).

Os sítios de ligação das quimiocinas MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  foram detectados na superfície de microvasos do cérebro humano, em locais independentes e específicos, sugerindo uma interação específica destas proteínas com o endotélio, com influência no curso da neuroinflamação (ANDJELKOVIC et al., 1999).

## 2.2 Células da Glia x Sistema Imunológico

### 2.2.1 Citocinas e as Células da Glia

As células gliais podem ser induzidas por várias citocinas pró e antiinflamatórias e podem expressá-las. A citocina IL-1 é mitogênica para os astrócitos, induz a formação da cicatriz glial e estimula a astrogliose reativa. Os astrócitos e a microglia, quando ativados podem secretá-la. O TNF- $\alpha$  é o principal mediador da resposta imune. Os macrófagos ativados são a maior fonte desta citocina, porém outras células quando ativadas podem expressá-la (linfócitos T, mastócitos, microglia, astrócitos). Seus efeitos são sobre a função endotelial (aumento da permeabilidade, propriedades adesivas para leucócitos) e a expressão do MHC classes I e II. É bastante tóxico para oligodendrócitos (apoptose) e pode estar associado a desmielinização do SNC. Pode induzir a expressão de fatores de crescimento (CsFs), que aumentam a resposta inflamatória, pela atração de granulócitos e macrófagos para o sítio da inflamação. Essas moléculas CsFs podem estimular a proliferação e a fagocitose na microglia. Os astrócitos ativados são a maior fonte de CsFs no SNC. O IFN- $\gamma$  é secretado por linfócitos ativados, sendo o sinal inicial da ativação glial e da indução da expressão de moléculas de MHC em astrócitos e na microglia (KETTENMANN & RANSON, 1995).

Em camundongos infectados com o vírus Sindbis (SV), a expressão das citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, LIF (fator inibitório da leucemia) e TGF- $\beta$  é feita pelas células intrínsecas do encéfalo em resposta à infecção viral. A IL-4 e a IL-10 foram as mais persistentes e mais fáceis de detectar, sugerindo uma predominância da resposta tipo Th2 neste tipo de infecção viral (WESSELINGH et al., 1994).

A interleucina IL-10 é expressa por células de gliomas humanos, estando relacionada a malignidade, a proliferação e a migração destas células neoplásicas. Pela hibridização *in situ* e pela imunocoloração de marcadores CD68, verificou-se que somente as células da microglia (linhagem macrófágica)

produzem IL-10 mRNA e são a maior fonte desta citocina em cultura primária de gliomas humanos (WAGNER et al., 1999). Por estudos *in vitro*, foi constatado que a interação entre linfócitos e microglia é dependente do contato de célula a célula. Esta interação resultou na produção de IL-10. Quando os receptores CD40/CD40L, CD28-CTLA-4/B7 e CD23 foram bloqueados, houve inibição da produção de IL-10, sugerindo seu envolvimento na resposta antiinflamatória (CHABOT et al., 1999).

No SNC, além da microglia e dos astrócitos, os oligodendrócitos também podem expressar MHC classe I, via IFN- $\gamma$ , para ligação com os linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Os neurônios são incapazes de apresentar antígenos para os linfócitos T, por não expressarem o MHC. Esta falta de expressão pode ser a responsável pela persistência das viroses neurotrópicas no SNC (KETTENMANN & RANSON, 1995).

A citocina antiinflamatória TGF- $\beta$  (fator de transformação e crescimento) produzida por células gliais, tem a função de restringir e/ou subregular a resposta imune no SNC. Inibe a expressão de MHC, a proliferação astrocitária, mas pode ser quimiotática para astrócitos e microglia para os locais de injúria. É promotora da diferenciação de oligodendrócitos (KETENMANN & RANSON, 1995). Os macrófagos e os astrócitos podem sintetizar TGF- $\beta$ , que também atua na angiogênese e na reparação do tecido nervoso injuriado (PERRY et al., 1993). Esta citocina quando induz quimiotaxia para os macrófagos, a microglia e os astrócitos, pode levar a infiltração e a gliose. Ela é considerada uma potente inibidora destas células no estado ativo (MERRILL & BENVENISTE, 1996). A imunoneutralização de TGF- $\beta$ 1 previne a formação de escaras no tecido nervoso. Portanto, a prevenção do recrutamento de macrófagos no cérebro, favoreceria a regeneração neuronal (PERRY et al., 1993). O efeito desta citocina, *in vitro*, sobre a microglia é a indução de apoptose, o que não ocorre com os astrócitos e os oligodendrócitos (XIAO & LINK, 1998).

A citocina TGF- $\beta$  juntamente com IL-10, atua como desativadora de macrófagos. Elas também suprimem a expressão de MHC e a secreção de citocinas pela microglia. A produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e óxido nítrico foi

observada em cultura de células da microglia de camundongos, tratadas com LPS. A inibição desta produção ocorreu com a adição de IL-10. O TGF- $\beta$  somente não suprimiu a secreção de IL-12 (LODGE & SRIRAM, 1996).

### 2.2.2 Quimiocinas e as Células da Glia

Quando atuam no SNC, as quimiocinas levam a migração, a proliferação e a ativação dos astrócitos e da microglia (MERRIL & BENVENISTE, 1996).

Na Esclerose Múltipla (MS) ocorre a expressão das quimiocinas IP-10, Mig e Rantes, nos processos agudos de desmielinização do cérebro. Os receptores destas quimiocinas foram identificados em linfócitos T, macrófagos e microglia ativada (SORENSEN et al., 1999). Foi verificado também, que MIP-1 $\alpha$  predominou em células gliais, MIP-1 $\beta$  na microglia, Rantes no infiltrado perivascular e MCP-1 em macrófagos e astrócitos das lesões crônicas da MS. Na Doença de Alzheimer, a expressão elevada de MIP-1 $\alpha$  (neurônios), MIP-1 $\beta$  (astrócitos) e IP-10 (neurônios) foi verificada na região das placas. Rantes e MCP-1 foram produzidas por astrócitos e oligodendrócitos (*in vitro*), após estímulo do  $\beta$ -amilóide, sendo consideradas como potentes quimioatraentes para os macrófagos e a microglia *in vitro* (BAJETTO et al., 2001).

A infecção viral do sistema nervoso resulta na expressão de quimiocinas por astrócitos, microglia e por células inflamatórias. Essa expressão é benéfica na atração de linfócitos que participam da resposta antiviral. Quando esta expressão torna-se crônica, devido a persistência do vírus, pode contribuir para alterações neuropatológicas. Isso ocorre pela atração de linfócitos T ativados e macrófagos dentro do SNC, com a liberação de fatores citotóxicos. No modelo de encefalite pelo vírus da hepatite do camundongo (MHV), houve a expressão inicial de IP-10 no dia um pós-inoculação (p.i.), nas áreas de replicação do vírus. No dia 6 p.i., além da difusão do vírus, houve a expressão de IP-10, Rantes, MIG, MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ . As células envolvidas nesta expressão foram os astrócitos e a microglia. Aos 12 dias p.i., os animais apresentaram severa desmielinização, associada à linfócitos T e macrófagos. Rantes foi a

quimiocina predominante nestes locais. IP-10 e MIG foram importantes na atração de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ . Rantes contribuiu para a defesa do hospedeiro por atrair linfócitos T e macrófagos. No quadro crônico, os leucócitos infiltrados, o vírus e Rantes contribuíram para o agravamento da desmielinização (LIU & LANE, 2001).

Nos quadros de meningite identificou-se que a migração leucocitária para o espaço subaracnóide foi controlada por  $\alpha$ -quimiocinas (IL-8, GRO- $\alpha$ ) e  $\beta$ -quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e Rantes). As primeiras atraíram neutrófilos para o foco de infecção e as últimas foram quimiotáticas para as células mononucleares. A produção local destas quimiocinas representou um estímulo diferencial para o recrutamento de leucócitos durante a meningite (LAVI et al., 1998).

#### **2.2.2.1 Astrócitos**

Os astrócitos são células importantíssimas para a manutenção da homeostase e a modulação da resposta imune no SNC. Eles são divididos em radiais (próximos aos ventrículos), fibrosos (substância branca) e protoplasmáticos (substância cinzenta). Os processos citoplasmáticos destas células fazem contato com os vasos sanguíneos, por meio dos “pés terminais”, colaborando para a resistência da BHE à penetração de moléculas no tecido nervoso. Estas células gliais podem apresentar neurofilamentos como marcadores celulares (GFAP, Vimentina e S-100). A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) aparece em células maduras e a vimentina em células da fase de desenvolvimento do tecido nervoso ou em fases proliferativas. A principal forma de resposta à injúria ao SNC é a astrogliose reativa. Os astrócitos reativos podem proliferar, apresentar hipertrofia dos processos citoplasmáticos e do núcleo e aumentar a expressão de GFAP e vimentina (CUNHA et al., 1993, ENG & GHIRNIKAR, 1994, KETTENMANN & RANSON, 1995, MACHADO & ALESSI, 1997, LEMOS & ALESSI, 1999, ALESSI et al., 2000, SLOANE et al., 2000, JARDIM et al., 2001, MAZZUCATO & ALESSI, 2001). Eles participam da

remoção da mielina e restos celulares neuronais de áreas degeneradas. Também podem apresentar efeitos deletérios, por interferirem com a transmissão nervosa, prevenir a remielinização ou por inibirem a regeneração axonal (KETTENMANN & RANSON, 1995).

Os astrócitos e a microglia tem a capacidade de apresentar antígenos para linfócitos T e podem ser ativados por lipopolissacarídeos (LPS), vírus e por outras citocinas (IL-1 $\alpha$ /  $\beta$  , IL-6 , TNF- $\alpha$ /  $\beta$  , IFN- $\alpha$ /  $\beta$  ). Estas células da glia, *in vitro*, expressam o gene *crg-2* , tanto quando estimuladas com IFN- $\gamma$  quanto por um paramixovírus. A indução deste gene pode contribuir para a resposta inflamatória imunomediada ou para o desenvolvimento de doenças autoimunes no parênquima nervoso. Este gene codifica quimiocinas pró-inflamatórias que regulam o crescimento celular e a inflamação (VANGURI & FARBER, 1994). Os astrócitos foram as primeiras células gliais a serem descritas como células apresentadoras de antígenos. Eles expressam MHC classe II, após a indução por IFN- $\gamma$ , que qualifica os mesmos para a apresentação de antígenos. Também são expressas, em astrócitos, várias moléculas de adesão (ICAM-1, LFA-3, VCAM, VLA). Os produtos do MHC classe II e estas moléculas, também podem ser induzidos por alguns vírus. A interação entre os linfócitos T e os astrócitos é bidirecional. Os astrócitos atuam como apresentadores de antígenos para os linfócitos e, estes liberam citocinas pró-inflamatórias, induzem a expressão do MHC e das moléculas de adesão e a proliferação glial. Muitos astrócitos podem estar envolvidos na subregulação da resposta imune, por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ), com a supressão da indução local de moléculas de MHC e da atividade de linfócitos T. A capacidade destas células em causar apoptose em linfócitos T ativados, foi descrita, nos locais de interação com os antígenos apresentados no local (KETTENMANN & RANSON, 1995).

Existem evidências de que os astrócitos adquirem motilidade quando ocorre injúria axonal. Quimiocinas liberadas pelo endotélio ou por neurônios, podem guiar os astrócitos da BHE até o sítio da injúria tecidual (DORF et al., 2000).

As quimiocinas MIP-1 $\beta$ , Rantes e MIP-1 $\alpha$  (em menor proporção) foram detectadas em níveis elevados no cérebro de pacientes com Esclerose Múltipla. Por meio da técnica de imunoistoquímica, a expressão destas quimiocinas foi vista em astrócitos (Rantes) e em macrófagos perivasculares e do parênquima nervoso (MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ ), em atividade fagocítica da mielina degenerada. A elevação dos níveis destas quimiocinas pode estar relacionada com a progressão da doença, pela atração de mais leucócitos pelas células ativadas da glia (BOVEN et al., 2000).

Os astrócitos de camundongos, podem migrar (*in vitro*), quando estimulados por baixas concentrações de MIP-1 $\alpha$ . O mesmo não ocorreu quando o estímulo foi de MIP-1 $\beta$  e SCF-1 $\alpha$ . A proliferação astrocitária pode ser mediada por SCF-1 $\alpha$  (BAJETTO et al., 2001).

#### **2.2.2.2 Microglia**

A microglia corresponde a cerca de 5 a 20% da população glial do SNC. São células altamente especializadas, que podem apresentar três morfologias diferentes no cérebro maduro, tais como, a microglia em repouso ou ramificada, a reativa com ramificações citoplasmáticas mais espessas e evidentes e a fagocítica ou amebóide, sempre presente em focos de morte celular e caracterizada por uma forma arredondada.

A microglia varia muito em morfologia e imunofenótipo, em processos patológicos. Após uma injúria, ela torna-se hipertrofiada, com processos citoplasmáticos espessados. Se há degeneração neuronal, a morfologia altera-se para formas arredondadas ("gitter cells"). No cérebro fetal, a morfologia celular é mais ramificada, nos processos patológicos esta célula perde as ramificações. Estas transformações na forma da célula, são acompanhadas por mudanças no fenótipo celular e na produção e secreção de citocinas. Os marcadores celulares, para estas células gliais, variam e alguns não aparecem na célula em repouso (vimentina, marcadores de macrófagos, marcadores do receptor do complemento CR3, MHC classes I e II, CD4). Esta célula glial faz

parte da “*glia limitans perivascular*”, pois seus processos citoplasmáticos estão interligados aos “pés terminais” de astrócitos. A observação desta proximidade vascular, resultou no termo “microglia perivascular”. As principais funções deste fagócito glial são a apresentação de antígenos, a citotoxicidade, a fagocitose e a indução da neovascularização. A célula microglial é quiescente no cérebro maduro, com morfologia ramificada. Alguns dias após a injúria, ela começa a expressar receptores que auxiliam na fagocitose (como os macrófagos), seus processos citoplasmáticos começam a retrair e a célula migra para as áreas injuriadas, iniciando a fagocitose. A principal discussão em torno destas células relaciona-se com sua origem. Várias hipóteses foram formuladas sobre a origem embrionária da microglia. A primeira foi a colonização do SNC em desenvolvimento por células tronco hematopoiéticas, na fase embrionária. Depois foi proposta a teoria da infiltração das células tronco da medula óssea, durante toda a vida do indivíduo. A última teoria é a de que a microglia teria origem da neuroectoderma, como as demais células gliais e os neurônios. Até o momento não se chegou a uma conclusão definitiva sobre a origem microglial (KETTENMANN & RANSON, 1995).

A microglia na fase de desenvolvimento, aparece na forma amebóide, progredindo para uma forma diferenciada com processos citoplasmáticos ramificados. Os astrócitos sinalizam parcialmente esta diferenciação morfológica e a motilidade microglial. Em culturas mistas de microglia e astrócitos do cérebro fetal humano, a diferenciação da microglia progrediu de amebóide para ramificada a bipolar e a tripolar. A velocidade de migração foi de 20 a 35µm / hora, em um estado ramificado e em confluência com astrócitos. A expressão de MIP-1 $\alpha$  e MCP-1 por astrócitos, demonstrou o papel destas quimiocinas na diferenciação e na motilidade microglial (REZAIE et al., 2002). No cérebro maduro, esta célula ramificada passa a forma amebóide fagocítica, após injúria, pela retração de seus delicados processos citoplasmáticos, sugerindo um retorno a sua forma primitiva da vida embrionária (STREIT & KINCAID-COLTON, 1995).

A microglia atua como célula apresentadora de antígenos, remove restos celulares durante traumas, regula a proliferação de astrócitos e a produção de citocinas e de outros fatores solúveis associados à resposta imune (McMANUS et al., 1998). Ela é mais eficiente na apresentação de antígenos do que os astrócitos. Estas células em repouso, expressam receptores para a porção FC da imunoglobulina. A expressão do MHC II é induzida pelo IFN- $\gamma$  (KETTENMANN & RANSON, 1995). Esta célula expressa baixos níveis de antígenos de superfície e possui um número reduzido de organelas de biossíntese e secreção, quando comparada com outras células derivadas da medula óssea (PERRY et al., 1993).

A glia fagocítica do SNC pode ser fonte de danos tóxicos aos neurônios. Esta célula libera neurotoxinas (*in vitro*), tais como, radicais livres (intermediários reativos do O<sub>2</sub>, proteinases, óxido nítrico) que levam a morte neuronal. Os astrócitos e a microglia (*in vitro*) podem regular a sobrevivência neuronal, pela secreção de diferentes produtos. Pela competição entre estas células gliais e seus produtos, sugere-se que mecanismos secretórios opostos podem influenciar (*in vivo*) a viabilidade tecidual. Os astrócitos tentam atenuar os efeitos tóxicos da microglia. Juntamente com a microglia, as células inflamatórias também podem ter efeitos neurotóxicos (KETTENMANN & RANSON, 1995).

A resposta de macrófagos e da microglia à degeneração neuronal se dá pela rápida ativação desta célula residente, sem recrutamento de neutrófilos e com a chegada de monócitos ao cérebro cerca de 48 horas após. Estes monócitos adquirem o fenótipo de células microgliais assim que chegam ao cérebro (PERRY et al., 1993). No Complexo Dementia da AIDS, a microglia participa do processo de migração de monócitos, através da barreira hematoencefálica, para o neurópilo. Isso ocorre, quando ela é estimulada pelo HIV-1 e/ou por sua interação com astrócitos ativados e, principalmente pela expressão de beta-quimiocinas (PERSIDSKY et al., 1999).

A rápida ativação microglial frente a mudanças patológicas mínimas é importante como um mecanismo de defesa do encéfalo contra as doenças infecciosas, traumas, isquemias e tumores. Quando imunocompetentes, estas

células expressam MHC (classes I e II), receptores para o complemento, produzem citocinas e óxido nítrico e expressam moléculas de adesão, tais como, LFA-3, ICAM-1 e CD-80 (XIAO & LINK, 1998).

McManus et al. (1998) observaram que células da microglia, *in vitro*, apresentaram um efeito pouco significativo na inibição da expressão de  $\beta$ -quimiocinas (induzida por LPS), quando tratadas com TGF- $\beta$ 1 e IL-10, diferindo de outros autores. No mesmo trabalho foi verificado que as citocinas associadas aos linfócitos Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), levaram a expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  em cultivo de microglia fetal humana.

Em culturas puras de células da microglia, de cérebro humano fetal e adulto, foi constatado um aumento da produção de IL-8 ( $\alpha$ -quimiocina) em resposta a LPS, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . O mesmo efeito foi inibido quando estas células foram tratadas com as citocinas antiinflamatórias IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (EHRlich et al., 1998).

Recentemente foi identificada a presença de fractalcina em neurônios normais e a presença de receptores para a mesma na microglia (MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 1999, BAJETTO et al., 2001). Foi observado que esta quimiocina estimula, *in vitro*, a migração, a mobilização do cálcio citoplasmático, a fosforilação proteica e a ativação enzimática da microglia. Somente não foi verificado um efeito direto sobre a proliferação celular (MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 1999).

A linha celular HMO6, é uma linha celular microglial derivada de tecido nervoso embrionário humano. Estas células quando estimuladas por LPS ou  $\beta$ -amilóide, expressaram IL-8, IL-10, IL-12, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e MCP-1 (NAGAI et al., 2001).

A microglia é o principal alvo do vírus da AIDS e o papel de receptores de quimiocinas na modulação da infecção desta célula é bastante discutida. Foi verificado que a inibição do receptor CCR5, bloqueou a infecção produtiva do vírus. As quimiocinas que se ligam a este receptor são Rantes e MIP-1 $\beta$  e, portanto seriam importantes moduladoras da infecção por HIV-1 na microglia. A

quimiocina MIP-1 $\alpha$  não teve a mesma importância neste processo inibitório (KITAI et al., 2000).

Em cérebros de pacientes com AIDS, por meio da técnica de RT-PCR, foi verificado que a expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  ocorreu em células negativas para o HIV. Portanto, a expressão destas proteínas ocorre concomitante com a transcrição viral, em células circunvizinhas às células infectadas. Foi constatado também, que o endotélio e as células inflamatórias perivasculares expressaram MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Rantes, MCP-3 e IP-10 (LAVI et al., 1998).

Nas neuropatias traumáticas, o recrutamento de macrófagos e da microglia, os quais são hábeis em liberar fatores críticos para a sobrevivência neuronal, podem influenciar no processo de morte dos neurônios (BAJETTO et al., 2001).

### **2.3 Mecanismos de evasão viral**

Várias viroses foram identificadas por codificar homólogos de quimiocinas e seus receptores. As quimiocinas tem um papel importante na formação de uma resposta imune antiviral efetiva. Entretanto, os agentes virais têm desenvolvido estratégias para controlar estas citocinas e seus receptores, seja por “seqüestrá-las” ou por reprogramá-las a combater o sistema imune. Outro mecanismo de ação viral é explorá-las como portas-de-entrada celular. Talvez, estes mecanismos de evasão viral reduzam a eficiência da resposta imune inata e adquirida, aumentem a difusão da infecção ou garantam uma vida longa para as células parasitadas (LUSSO, 2000).

Três famílias de vírus (*Retroviridae*, *Poxviridae* e *Herpesviridae*) podem exercer estes efeitos de evasão imune. Os retrovírus atuam sobre os pró-oncogenes celulares, que regulam a sobrevivência e a proliferação celulares. O herpesvírus e o poxvírus têm efeitos seletivos sobre múltiplas famílias de proteínas, incluindo as moduladoras da resposta imune, como as quimiocinas e seus receptores (LITTMAN, 1998, LUSSO, 2000).

Alguns herpesvírus humanos podem expressar quimiocinas virais, com o mesmo grau de homologia genética e funcional de suas contrapartidas celulares. Estas quimiocinas podem atuar por mecanismos diferentes, como o recrutamento de novas células alvo para a infecção ou a indução de uma resposta inflamatória inespecífica (DAIRAGHI et al., 1998, LUSSO, 2000). Estes vírus podem codificar várias quimiocinas homólogas do grupo CXC (UL146), CC (U83) e o Herpesvírus do Sarcoma de Kaposi pode codificar vMIP-I, vMIP-II e vMIP-III, que ligam-se e/ou competem por receptores específicos (LUSSO, 2000).

Outra estratégia viral para inibir a atividade das quimiocinas é a adsorção de vírus à membrana da célula alvo ou a produção de receptores virais de quimiocinas. Nestes casos, o mecanismo de ação é a inibição da ligação da quimiocina ao receptor, limitando o recrutamento de células inflamatórias para o tecido infectado. A competência funcional destes receptores virais pode ser verificada ao induzirem a uma sinalização intracelular. A migração direcionada pela célula infectada poderia sustentar e disseminar a infecção viral (DAIRAGHI et al., 1998, LUSSO, 2000).

As primeiras descobertas sobre a ação das quimiocinas sobre as retrovírus das imunodeficiências foram recentes (Cocchi et al. 1995, citado por LUSSO, 2000). Relacionaram-se a ação inibitória das  $\beta$ -quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e Rantes sobre a replicação do HIV-1, HIV-2 (AIDS) e do vírus da imunodeficiência dos símios (SIV). Esse efeito ocorreu, por meio de inibidores, derivados de linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup>. A identificação do receptor CXCR4 como co-receptor para a fusão da glicoproteína do envelope viral do HIV, associado ao receptor CD4, foi fundamental para a compreensão dos mecanismos de invasão celular do vírus. A partir daí, identificou-se CXCR4 como co-receptor exclusivo para cepas do HIV-1 com tropismo para linfócitos T. Rantes, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  mostraram uma atividade inibitória seletiva para as cepas de HIV-1 com tropismo para macrófagos, por meio do receptor CCR5. Este último receptor atualmente é considerado como co-receptor do vírus para as linhas celulares macrofágicas. Por este motivo, recentemente foi proposta uma nova

classificação para o HIV-1, baseado em seus co-receptores. O vírus pode ser denominado de cepa R5 (CCR5), X4 (CXCR4) e X4R5 (ambos) (LITTMAN, 1998, LUSSO, 2000).

Na AIDS, a presença de apoptose em vários tipos de células, incluindo neurônios e linfócitos T  $CD_8^+$ , pode ser mediada pela sinalização por meio do receptor CXCR4 (LUSSO, 2000). Ainda não está confirmado se a morte neuronal que ocorre na AIDS está relacionada com a infecção direta destas células pelo HIV ou se é pelo efeito indireto da interação dos neurônios com produtos virais ou com produtos liberados das células infectadas (LITTMAN, 1998).

Vários estudos experimentais induzindo alterações genéticas em quimiocinas/receptores indicaram que essas são capazes de influenciar a susceptibilidade ou o curso da AIDS, tanto por reduzir a expressão destes receptores quanto por aumentar a produção de quimiocinas supressoras. A resistência geneticamente determinada ao HIV, foi observada em indivíduos caucasianos homozigotos, que não possuíam o receptor CCR5 de  $\beta$ -quimiocinas. Por este fato, os linfócitos T  $CD_4^+$  e os macrófagos foram resistentes a infecção pelo vírus da AIDS. Os indivíduos heterozigotos não apresentaram uma redução do risco de infecção, mas o curso da doença foi retardado (LUSSO, 2000).

O vírus da AIDS induz, *in vivo*, a produção de grandes quantidades de Rantes, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  no tecido linfóide de pacientes no estágio inicial da doença. Este tipo de expressão não foi visto em outras doenças infecciosas. Essa expressão foi evidente em macrófagos dos centros germinativos e em linfócitos T da zona extrafolicular. Estes mecanismos virais seriam uma estratégia de sobrevivência do retrovírus, para prevenir a rápida difusão viral e a morte do hospedeiro? Ou seriam estratégias para indução de uma resposta imune inespecífica? (LUSSO, 2000).

O vírus Epstein-Barr (EBV), um herpesvírus humano, codifica uma proteína (BCRF1) homóloga a IL-10 (citocina antiinflamatória), com isto, há a

inibição da síntese de IFN- $\gamma$  e a atividade antiviral da célula é anulada (KOSZINOWSKI et al., 1991).

## 2.4 Encefalite Experimental pelo Vírus da Estomatite Vesicular

O vírus da estomatite vesicular (VEV) é RNA, pertencente a família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovírus*, infecta naturalmente eqüinos e bovinos, produzindo lesões vesiculares epidermóides, semelhantes as que aparecem na febre aftosa e em outras doenças vesiculares. A instilação intranasal do vírus, em camundongos, pode causar meningite, ventriculite, necrose da substância cinzenta e morte (FORGER et al., 1991).

Quando camundongos BALB/c foram inoculados com um VEV, mutante G41, ocorreram alterações neuropatológicas, paralisia de membros, perda de peso e morte. As principais alterações morfológicas descritas na medula espinhal foram a inflamação da substância cinzenta (6 dias p.i.), a leptomeningite (1-2 sem. p.i.), a destruição neuronal (infecção pelo vírus) e a desmielinização primária. Inicialmente predominaram células da microglia com atividade fagocítica e posteriormente os plasmócitos (DAL CANTO et al., 1979).

Em modelos que utilizam a via intranasal de inoculação do VEV, foi constatado que camundongos mais velhos eram resistentes a infecção do SNC, talvez por mudanças estruturais que ocorram com a idade. Quando a via de inoculação foi a intracerebral, houve igual susceptibilidade para animais jovens e adultos (SABIN & OLITSKY, 1938).

Na relação entre a anatomia e imunorreatividade do VEV no cérebro de camundongos, constatou-se que o vírus segue a infecção da camada glomerular do bulbo olfatório, difunde-se pelos ventrículos e utiliza o transporte retrógrado (dentro de axônios). Algumas áreas importantes do cérebro, tais como, o glomérulo olfatório, o tálamo, o córtex e o hipocampo apresentaram um envolvimento menor na disseminação viral (HUNEYCUTT et al., 1994). Na associação da neuropatogênese do VEV com a resposta celular de linfócitos T, foi constatado que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> limitam a replicação e a difusão

transsináptica e ventricular do VEV, promovendo assim a recuperação do quadro de encefalite viral (HUNEYCUTT et al., 1993).

Para avaliar a via de infecção do encéfalo pelo VEV, camundongos foram bulbectomizados ou sofreram a destruição química do epitélio olfatório. A invasão primária do cérebro ocorreu pelo nervo olfatório. Com a realização dos procedimentos que impedem a migração do vírus, ele multiplicou-se nas células da lâmina própria do epitélio olfatório e atingiu a placa cribiforme, o líquido e o parênquima nervoso. Portanto, confirmou-se que o vírus pode utilizar vias não-neuronais para chegar até o tecido nervoso (PLAKHOV et al., 1995).

A comparação das lesões encefálicas em camundongos inoculados com VEV, via intracerebral (IC) ou intranasal (IN) foi avaliada, constatando-se que a via IC apresentou mínimas alterações morfológicas às 18 horas p.i., porém o vírus já foi detectado próximo ao sistema ventricular. Na via IN, as lesões predominaram no bulbo olfatório, lobo piriforme e hipocampo (MIYOSHI & HARTER, 1971).

A citocina IL-12 é uma potente ativadora da produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* e é mediadora da resposta imune inata e adquirida. A IL-12 foi utilizada, em camundongos, para testar a modulação da resposta imune do hospedeiro na eliminação viral e na sobrevivência do hospedeiro. Foi comprovado que houve inibição da infecção do SNC pelo VEV, diminuição do título viral, indução da expressão de MHC classes I e II, aumento da infiltração por células T e a inibição da apoptose induzida pelo vírus (BI et al., 1995).

A presença de anticorpos específicos para VEV é importante para a prevenção inicial da difusão deste agente no SNC. Os linfócitos B são necessários para a prevenção precoce da encefalite, porém não garantem a sobrevivência a longo termo. Esta última função é comandada pelos linfócitos T. A interação entre os dois tipos celulares é fundamental para a aquisição de uma resistência completa ao vírus (THOMSEN et al., 1997). Por intermédio do modelo experimental de infecção pelo VEV, foi constatado que a produção cerebral de IL-6 pode utilizar vias dependentes ou não de linfócitos T. A detecção da síntese intratecal desta citocina, que atua no desencadeamento da

maturação de linfócitos B em plasmócitos, explica a resposta imune humoral presente no cérebro com infecção viral (FREI et al., 1989).

Estudos recentes com o VEV (intranasal), a respeito do envolvimento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , demonstraram que o tratamento com anticorpos neutralizantes para estas citocinas pró-inflamatórias reduziu a intensidade das lesões cerebrais. A mortalidade dos camundongos estava associada a intensidade da inflamação e a multiplicação do vírus. A síntese da enzima óxido nítrico sintetase contribuiu para o agravamento das lesões nervosas causadas pelo vírus (MACHADO, 1999). Pelo mesmo modelo viral de encefalite, foi verificado que o padrão de migração do VEV (via intranasal) iniciou pelo bulbo olfatório, atingiu o diencéfalo e posteriormente chegou até a ponte. Os processos degenerativos e necróticos, associados a uma meningoencefalite, foram os achados mais freqüentes, sempre relacionados a astrocitose reativa na periferia das áreas de necrose (MAZZUCATTO, 2000, MAZZUCATTO & ALESSI, 2001).

O desenvolvimento das alterações neurológicas da encefalite experimental por VEV (via intracerebral) foi comprovado em camundongos de diferentes idades. Da mesma forma, foi constatado que as alterações degenerativas e necróticas neuronais relacionaram-se a alterações ultra-estruturais em mitocôndrias e no retículo endoplasmático dos animais infectados. O vírus foi encontrado em neurônios e nas células ependimais (FEDERICI, 2000). Utilizando a via intranasal, Grodums (1976) verificou por microscopia eletrônica, o VEV nas células ependimais e subependimais, associado a necrose destas células e a separação da superfície ventricular. O endotélio do plexo coróide apresentou mudanças morfológicas, porém não foram observadas partículas víricas dentro ou nas proximidades do mesmo.

JARDIM (2003) não observou a expressão constitutiva de MIP-1 $\beta$  nos grupos de camundongos não infectados, mas a verificou nos grupos com 4 dias p.i. (G2) e 5 a 6 dias p.i. (G3), por meio da técnica de RT-PCR. Já MIP-1 $\alpha$  e Rantes tiveram expressão constitutiva nos animais controle e nos camundongos inoculados com VEV essa expressão aumentou significativamente, com a evolução da encefalite viral.

Outros modelos virais de encefalite tem surgido. O modelo de encefalite com o vírus da hepatite do camundongo (coronavírus), quando inoculado via intracerebral, causou uma encefalomielite aguda. Houve a replicação viral em células da glia e em neurônios, associada a infiltrado leucocitário no neurópilo. O uso de camundongos “Knockout” para IFN- $\gamma$ , resultou em severidade da doença e diminuição do controle da replicação viral. Foi sugerido que uma resposta Th1, caracterizada por linfócitos T CD<sub>4</sub> e CD<sub>8</sub> e a expressão de IFN- $\gamma$ , é necessária para a proteção do hospedeiro frente ao agravamento das lesões nervosas e para eliminar o vírus (LIU & LANE, 2001).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais experimentais

Foram utilizadas duas linhagens de camundongos machos, no modelo de encefalite experimental pelo VEV, discriminadas abaixo:

(a) Linhagem Swiss: um grupo de 38 animais entre 18 a 22 dias de idade <sup>1</sup>, para a instilação intranasal do vírus. Um lote de 20 camundongos, da mesma idade<sup>2</sup>, para a inoculação intracerebral.

(b) Linhagem B6:

- Linhagem C57BL/6 IL-4<sup>-/-</sup> ("Knockout" para IL-4): 8 (9) indivíduos, com cerca de 5 a 6 semanas<sup>3A</sup> para instilação intranasal. Um animal foi utilizado como controle negativo.

- Linhagem C57BL/6: com 5 (6) camundongos de aproximadamente 5 a 6 semanas de idade<sup>3B</sup> para instilação intranasal. Um animal foi utilizado como o controle negativo da infecção.

Os animais da linhagem Swiss foram mantidos em gaiolas, com ração comercial e água *ad libitum*. Os camundongos das linhagens B6 permaneceram em ambiente com temperatura controlada e receberam ração e água esterilizadas *ad libitum*. A cama e as gaiolas também foram esterilizadas.

O experimento foi desenvolvido nas instalações do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da UNESP, Campus de Jaboticabal, SP.

#### 3.2 Vírus da estomatite vesicular bovina (VEV)

##### 3.2.1 Preparação das amostras virais

---

<sup>1</sup> Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), em Ribeirão Preto, SP.

<sup>2</sup> Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, SP.

<sup>3</sup> A) Biotério do Depto. de Bioquímica e Imunologia (FMRP/USP)./ B) Depto. de Genética (FMRP/USP).

O vírus foi inoculado, via intracerebral, em 20 camundongos da linhagem Swiss por inóculo de 5 $\mu$ L da suspensão viral / animal. Os sintomas neurológicos iniciaram em torno de 36 horas pós-inoculação (p.i.). Os animais foram sacrificados com éter etílico por via inalatória. A colheita dos encéfalos foi feita imediatamente após o sacrifício. Os cérebros foram macerados cuidadosamente em um gral, com a adição de uma pequena quantidade de areia estéril e cerca de 0,5mL / cérebro de solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,4) contendo o antibiótico Pentabiótico na dose de 6000 UI/mL para 100mL de PBS. O macerado de cérebro foi centrifugado a 1000 x g /10 minutos. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 50 $\mu$ L e estocado em “freezer” - 80°C (MACHADO, 1999). Uma alíquota de 1mL foi reservada para determinar o título do VEV pela técnica de microtitulação em placas.

Um lote de cérebros de camundongos saudáveis, da mesma idade, sexo e linhagem, foi preparado e armazenado da mesma forma, para ser utilizado como o controle do modelo experimental de encefalite por VEV.

### 3.2.2 Titulação viral

O título viral<sup>4</sup> foi determinado por meio da técnica de microtitulação em placas (BUSSEAU et al., 1982). A diluição do vírus foi obtida pela visualização dos efeitos citopáticos em 50% do tapete celular (TCID<sub>50</sub>).

Utilizaram-se placas de cultivo celular com 96 cavidades (Corning). A linhagem celular utilizada foi a BHK21<sup>5</sup>. As células foram semeadas na microplaca de cultivo celular, com 10ml de meio essencial mínimo (MEM) contendo antibiótico (penicilina e estreptomicina, 10000 UI) e 10% de soro fetal bovino (Sigma). A suspensão celular usada para semear a placa foi de 10<sup>3,7</sup> células/mL, com um volume final de 100 $\mu$ L em cada orifício. Cerca de 24 horas após, houve a adesão do tapete celular ao fundo da placa. O meio de cultura foi

---

<sup>4</sup> Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP, Câmpus de Araçatuba, SP), Laboratório de Microbiologia do Curso de Medicina Veterinária.

<sup>5</sup> Laboratório de Virologia do Instituto Biológico de São Paulo.

então removido e 100µL da suspensão viral foi previamente filtrada em filtros de 0,22µm (Millipore), adaptados a uma seringa. Esta suspensão foi adicionada sobre as células em cultivo. Seguiu-se incubação por uma hora e trinta minutos, em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente a suspensão contendo o VEV foi removida e as células permaneceram em incubação por mais três dias, em MEM com 2% de soro fetal bovino e antibiótico (penicilina e estreptomicina, 10000 UI), na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C (CARDOSO et al., 2000). Procedeu-se a verificação dos efeitos citopáticos e o cálculo do título viral (REED & MUENCH, 1938). O título obtido foi de 10<sup>5,8</sup> TID<sub>50</sub> / mL. A dose infectante foi de 10<sup>2,8</sup> vírus/µL da suspensão. Cada camundongo recebeu 3µL de suspensão viral por via intranasal (3 x 10<sup>2,8</sup> vírus/animal).

### 3.3 Delineamento experimental

#### 3.3.1 Grupos experimentais

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos experimentais, de acordo com a linhagem. Na Tabela 2 descreve-se o resumo do delineamento experimental.

TABELA 2. Delineamento experimental dos grupos de camundongos do modelo de encefalite por VEV.

| GRUPOS | LINHAGEM                          | TRATAMENTO            | ANIMAIS SACRIFICADOS |             |                 |
|--------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------|-----------------|
|        |                                   |                       | 2 dias p.i.          | 4 dias p.i. | 5 a 6 dias p.i. |
| G1     | Swiss                             | VEV <sup>1</sup>      | 8                    |             |                 |
| G2     | Swiss                             | VEV <sup>1</sup>      |                      | 8           |                 |
| G3     | Swiss                             | VEV <sup>1</sup>      |                      |             | 8               |
| G4     | Swiss                             | Controle <sup>2</sup> |                      |             | 8               |
|        | C57BL/6 IL-4-/-*<br>C57BL/6 (B6)* | Controle <sup>2</sup> |                      |             | 2               |
| G5     | Swiss                             | Controle <sup>3</sup> |                      |             | 6               |
| G6     | C57BL/6 IL-4-/-                   | VEV <sup>1</sup>      |                      |             | 8               |
| G7     | C57BL/6 (B6)                      | VEV <sup>1</sup>      |                      |             | 5               |

1 – Animais inoculados por via intranasal, com uma suspensão contendo o vírus, a partir de um macerado de cérebros de camundongos inoculados via intracerebral, da linhagem Swiss; 2 - Animais inoculados por via intranasal, com uma suspensão de macerado de cérebros de camundongos normais, da linhagem Swiss; 3 - Animais inoculados por via intranasal, com solução salina estéril; \* Cérebros processados para congelamento.

Os animais foram sacrificados segundo o protocolo descrito por Machado (1999), nos três diferentes tempos descritos na Tabela 2, que corresponderam ao 2º. e 4º. dias p.i. (grupos G1 e G2 respectivamente) e no início dos sinais clínicos (fase convulsiva) entre o 5º. e 6º. dias p.i. (grupos G3, G6, G7). Os camundongos dos grupos controle (G4 e G5) foram sacrificados juntamente com os animais dos grupos infectados por VEV.

A suspensão viral foi administrada por meio de uma micropipeta, na narina direita dos camundongos sedados com éter. Os animais inoculados com o vírus foram observados diariamente, avaliando-se o aparecimento de sinais clínicos, até o momento do sacrifício nos dias pré-determinados.

### **3.3.2 Colheita e preparo do material para o processamento histológico**

Todos os animais dos grupos experimentais foram perfundidos, via transcardíaca, antes da colheita dos encéfalos. Em cada grupo foi utilizada a metade dos camundongos para a perfusão com PBS (pH 7,2) e a outra metade com solução de formalina a 10% tamponada com fosfatos (pH 7,2). Os encéfalos perfundidos com PBS foram cortados no micrótomo de congelação, para a técnica de imunoistoquímica com os anticorpos comerciais anti-Mip1 $\alpha$ , anti-Mip1 $\beta$  e antimicroglia. O material perfundido com formalina tamponada, permaneceu 8 a 12 horas nessa solução e depois foi submetido ao procedimento de rotina para inclusão em parafina<sup>6</sup>. Cortes seriados foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E) ou utilizados na imunistoquímica para a marcação do VEV e dos astrócitos.

A perfusão dos animais foi feita da seguinte forma:

#### **a) Cérebros submetidos ao congelamento**

Os camundongos foram anestesiados, via inalatória, com éter etílico. Procedeu-se a abertura da cavidade torácica, a partir da região esternal, com

---

<sup>6</sup> Laboratório de Histopatologia do Depto. de Patologia Veterinária (UNESP – FCAV, Jaboticabal, SP).

secção do diafragma. O coração foi puncionado no ventrículo esquerdo, com uma agulha nº. 23, acoplada a um equipo de soro e frasco contendo a solução de perfusão. Foi feita a administração lenta de PBS a 4°C, via transcardíaca, seguida pela secção do átrio direito, para a eficiente drenagem do sangue. O processo foi concluído quando o animal apresentou acentuada palidez de vísceras, principalmente do fígado.

Os encéfalos foram retirados inteiros da caixa craniana e imediatamente mergulhados em um frasco com solução de N-Hexano (Synth) resfriada. Posteriormente, este frasco contendo os cérebros foi mergulhado em nitrogênio líquido por 5 a 10 segundos, para o rápido congelamento do material. Em seguida, os cérebros foram armazenados em “freezer” -80°C, até o momento dos cortes em micrótomo de congelamento. Os encéfalos foram cortados com espessura aproximada de 5µm. A pré-fixação foi feita com acetona P.A. (-20°C), por cinco minutos. Posteriormente, as secções de cérebro foram mantidas em temperatura ambiente por uma hora para secagem, antes de serem estocadas em “freezer” -80°C, até o momento da realização da técnica de imunohistoquímica. As secções de 5µm de espessura foram cortadas no plano horizontal, como exemplificado na Figura 1.



FIGURA 1 – Plano de corte horizontal do cérebro de camundongo, utilizado no modelo de encefalite por VEV, para as imunohistoquímicas de quimiocinas e microglia (Fonte:disponível em <[http://www.nervenet.org/MBL/atlas232/atlas232\\_frame.html](http://www.nervenet.org/MBL/atlas232/atlas232_frame.html)>. Acesso em 21/09/02).

## b) Cérebros incluídos em parafina

O protocolo de perfusão dos animais, com formalina tamponada, foi o mesmo da perfusão com PBS. Após a colheita, os encéfalos permaneceram por 8 a 12 horas no formol. Em seguida, os cérebros foram transferidos para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até o processamento e inclusão em parafina. Os planos de corte foram diferentes, nos cérebros incluídos em parafina. Um esquema representativo dos planos de corte utilizados é demonstrado na Figura 2.

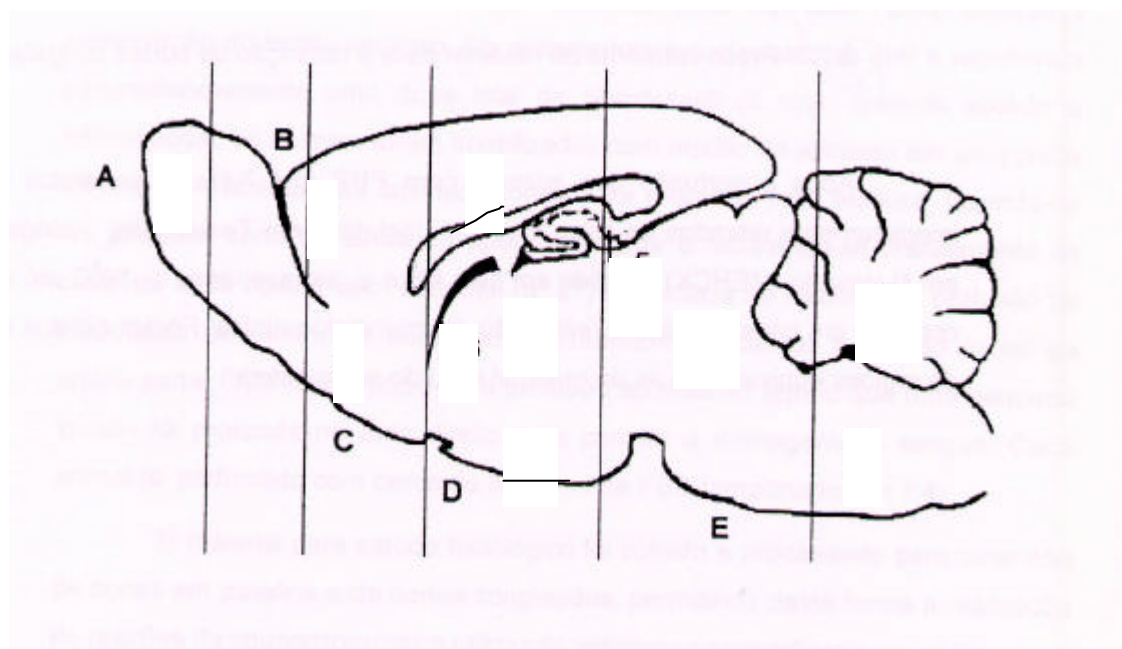


FIGURA 2 – Desenho esquemático de um plano de corte transversal do cérebro de camundongo, utilizado no modelo de encefalite por VEV. As letras correspondem às seguintes áreas: (A) Bulbo Olfatório; (B) Fissura Rinal; (C) Quiasma Óptico; (D) Infundíbulo Hipofisário; (E) Ponte (modificado de MACHADO, 1999).

Os encéfalos processados para a inclusão em parafina, foram cortados longitudinalmente em alguns animais e transversalmente em outros, dentro do mesmo grupo (Figura 2), para comparar qual seria o plano de corte mais

eficiente para a visualização da distribuição e extensão das lesões degenerativas e inflamatórias no neurópilo.

### **3.3.3 Análise em microscopia de luz**

Nas secções de cérebro incluídos em parafina, da parte que foi destinada para H&E, fez-se a avaliação das alterações morfológicas do encéfalo, de todos os grupos em estudo. As alterações histopatológicas foram avaliadas pela classificação do tipo de lesão (degenerativa / inflamatória). A localização das lesões foi determinada e sua intensidade avaliada em discreta (+); moderada (++) ou acentuada (+++). As lesões eram discretas quando observava-se pequenos focos de necrose ou inflamação nas áreas estudadas. A classificação de moderada correspondia a lesões maiores, que poderiam ser multifocais a localmente extensas. As lesões acentuadas envolviam grande parte das áreas anatômicas avaliadas, muitas vezes com coalescência entre elas.

Nos encéfalos submetidos a imunoistoquímica, tanto de congelação quanto os incluídos em parafina, foram observadas a presença de células positivas para os anticorpos utilizados, a intensidade da coloração imunoistoquímica e a associação da imunomarcacão com a presença de lesões nas diferentes regiões do cérebro.

### **3.3.4 Técnica de imunoistoquímica**

Os cortes dos cérebros dos camundongos foram submetidos ao Método do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vectastain ABC Kit, VECTOR, PK 4000), utilizando-se os anticorpos primários e secundários descritos na Tabela 3:

TABELA 3 – Anticorpos utilizados para a imunomarcação dos cérebros dos camundongos do modelo experimental de encefalite pelo VEV.

| ANTICORPOS PRIMÁRIOS             | ESPÉCIES DE ORIGEM                                                 | DILUIÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO    | ANTICORPOS SECUNDÁRIOS                                               | DILUIÇÃO | TEMPO DE INCUBAÇÃO |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|--------------------|
| anti-VEV <sup>4</sup>            | IgG de cobaio <sup>7</sup>                                         | 1:1500   | 12 horas <sup>1</sup> | anti-IgG biotinilada de cobaio produzida em cabra (Vector, BA-7000)  | 1:100    | 30 min.            |
| Anti-GFAP <sup>2, 4, 6</sup>     | Anti-IgG bovina produzida em coelho (Dako, Z0334)                  | 1:500    | 12 horas <sup>1</sup> | anti-IgG biotinilada de coelho produzida em cabra (Vector, BA-100)   | 1:300    | 30 min.            |
| anti microglia <sup>5</sup>      | anti-IgG de rato produzida em camundongo (OX-42, Serotec, MCA275G) | 1:100    | 12 horas <sup>1</sup> | anti-IgG biotinilada de camundongo produzida em cabra (Dako, E0433)  | 1:100    | 30 min.            |
| anti-MIP-1 $\alpha$ <sup>5</sup> | anti-IgG de camundongo produzida em cabra (SANTA CRUZ – SC-1383)   | 1:100    | 18 horas <sup>3</sup> | anti-IgG biotinilada de cabra produzida em coelho (VECTOR, BA-5000). | 1:100    | 1 hora             |
| anti-MIP-1 $\beta$ <sup>5</sup>  | anti-IgG de camundongo produzida em cabra (SANTA CRUZ – SC-1387).  | 1:100    | 18 horas <sup>3</sup> | Anti-IgG biotinilada de cabra feita em coelho (VECTOR, BA-5000).     | 1:100    | 1 hora             |

1 – Incubação de 20 horas; 2 – GFAP = proteína glial fibrilar ácida; 3 – Incubação por 26 horas; 4 – Cortes em parafina; 5 – Cortes congelados; 6 – Segundo o fabricante, existe forte reação cruzada com GFAP humano, felino, bovino, asinino, ovino; de cobaio, de hamster, de canguru, de galinha e do rato.

Um resumo dos protocolos para os ensaios de imunoistoquímica das secções de congelação é descrito na Tabela 4.

Os cérebros pré-fixados permaneceram uma hora em temperatura ambiente para a secagem dos cortes. Posteriormente foram banhados três vezes (5 min. cada) em solução tampão de PBS (pH 7,2), antes de cada um dos procedimentos descritos nas Tabelas 3 e 4. A única exceção esteve entre o bloqueio dos sítios inespecíficos e o anticorpo primário. Em seguida incubou-se

com o anticorpo secundário e posteriormente com o Complexo ABC (30 min.), precedidos de banhos com PBS. Todas as etapas de incubação dos cortes de cérebro, foram feitas em câmara úmida e à temperatura ambiente. A incubação com os anticorpos primários ocorreu a 4°C.

A revelação da imunomarcação foi feita com o cromógeno Diaminobenzidina – DAB (KPL, XB100), por 5 a 8 minutos, dependendo do anticorpo utilizado. Em seguida, os cortes eram banhados em água destilada, antes da contracoloração com Hematoxilina de Harris durante 1 a 2 min., preparada na diluição de 2:1 com água destilada. Após a coloração de fundo, os cortes permaneceram por 3 min. em água corrente, antes da desidratação e montagem em Bálsamo do Canadá.

TABELA 4 – Principais procedimentos da imunomarcação dos cérebros processados para congelação.

| <b>Bloqueio Peroxidase Endógena (20 min.)</b> | <b>Bloqueio dos sítios inespecíficos (30 min.)</b> | <b>Tipo de imunomarcação</b>   |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| Dako / S2001                                  | Soro normal de coelho (KPL, VG039)                 | MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ |
| Dako / S2001                                  | Soro normal de cabra (KPL, XD024)                  | Microglia                      |

Os encéfalos incluídos em parafina foram desparafinados por 1h. em estufa a 56°C. O processo de hidratação dos cortes de cérebro seguiu banhos de cinco minutos em xilol (três vezes), álcool absoluto (duas vezes), álcool à 70% e 50% (uma vez) e água destilada. Posteriormente seguiram-se os banhos triplos em PBS entre os procedimentos descritos na Tabela 5.

<sup>7</sup> Laboratório de Virologia, FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP

Tabela 5 - Principais procedimentos da imunomarcção de cérebros incluídos em parafina.

| Bloqueio<br>Peroxidase<br>Endógena | Recuperação<br>Antigênica<br>(15 min.) | Bloqueio dos sítios<br>inespecíficos<br>(30 min.) | Tipo de imunomarcção |
|------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|
| Dako / S2001<br>(20 min.)          | Pronase <sup>8</sup><br>(Dako, S2013)  | Soro normal de cabra<br>(KPL, XD024)              | VEV<br>Astrócitos    |

Os procedimentos posteriores, desde o anticorpo primário até a montagem das lâminas, foram similares ao protocolo de congelação. A incubação com pronase foi feita à temperatura ambiente.

### 3.3.5 Densidade celular e morfometria astrocitária

Os cérebros positivos para GFAP foram submetidos aos dois métodos de avaliação (número de astrócitos e diâmetro nuclear). Para esta análise foram selecionadas quatro áreas do encéfalo dos camundongos dos grupos controle e infectados. As áreas selecionadas foram o bulbo olfatório, o corpo caloso, o hipocampo e o tronco cerebral. Estas áreas foram escolhidas por serem as mais importantes quanto à presença de lesões (H&E) e por apresentarem uma presença significativa de astrócitos positivos para GFAP.

A densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , foi avaliada pela contagem de células positivas somente na região do tronco cerebral. O plano de corte utilizado nos cérebros congelados causou a uma grande variação no aparecimento das demais áreas. Isso impossibilitou a contagem padronizada nas áreas, por isso foi considerado apenas o tronco cerebral.

#### a) Densidade celular

<sup>8</sup> Preparo: 0,1mL Pronase (-20°C) + 1,0mL de Tris / HCl. (0,05M).

Em cada área selecionada foram feitas as contagens do número de astrócitos positivos, utilizando-se uma lente integradora acoplada a ocular do microscópio de luz Nikon YS2, com objetiva de 40x. Essa lente possui uma área quadriculada, que foi considerada como um campo microscópico, onde foram contadas apenas as células presentes neste local. Em cada animal foram contados 30 campos / área anatômica selecionada. Para facilitar a contagem foi utilizado um contador portátil de células.

O mesmo procedimento foi aplicado para os encéfalos de congelação, corados para a  $\beta$ -quimiocina Mip-1 $\alpha$ . Também foram considerados 30 campos microscópicos / animal, com objetiva de 40x.

#### **b) Morfometria de astrócitos**

Avaliou-se a variação no diâmetro nuclear do astrócito, nas diferentes áreas e entre os grupos experimentais testados. Para isso, foi utilizado o Programa de Análise de Imagens Image-Pro Plus (versão 3.0)<sup>9</sup>. A objetiva utilizada foi a de 20x, do microscópio de luz Olympus BX50. O diâmetro foi medido nas células GFAP positivas, considerando-se um total de 50 células / área anatômica / animal. A unidade de medida do diâmetro nuclear de astrócitos foi dada em micrômetros ( $\mu$ m). As áreas selecionadas foram as mesmas da densidade astrocitária.

#### **3.3.7 Análise estatística**

As características estudadas foram a densidade de astrócitos (DA) e da  $\beta$ -quimiocina MIP-1 $\alpha$  (MIP) e a morfometria nuclear astrocitária (MA).

O delineamento experimental para DA e MA foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. O modelo matemático proposto incluiu os efeitos fixos

---

<sup>9</sup> Laboratório de Imunopatologia, do Depto. de Patologia Animal (FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP).

de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, corpo caloso, hipocampo e tronco cerebral) e a interação entre grupo e área. O efeito de animal dentro de grupo foi utilizado como resíduo no Teste de Hipótese para o efeito de grupo.

Para MIP, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Apenas os efeitos fixos de grupo (3 a 5) e animal dentro de grupo foram incluídos no modelo matemático proposto. No Teste de Hipótese para o efeito de grupo, considerou-se o efeito de animal dentro de grupo como resíduo.

Os grupos experimentais que foram incluídos na análise estatística foram G3, G4 e G5.

As análises de variância, as médias estimadas e os testes de comparação de médias foram obtidos utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System, versão 6.12).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Sinais clínicos**

Os animais inoculados com o VEV apresentaram, em torno do 5<sup>o</sup>. ao 6<sup>o</sup>. dias p.i., sinais clínicos que geralmente iniciavam com prostração, pêlos arrepiados e anorexia. Estes sinais foram seguidos por sintomatologia nervosa, caracterizada por ataxia de membros posteriores, andar em círculos e posteriormente paralisia dos membros pélvicos, decúbito lateral e taquipnéia que evoluía para bradpnéia próxima à morte. Alguns dos animais que apresentavam ataxia de membros posteriores, mordiam-se nas patas e na cauda.

Antes da morte a maioria dos animais apresentou um quadro convulsivo.

Alguns camundongos apresentaram opistótono antes do quadro convulsivo, bem como, conjuntivite unilateral. A constatação da conjuntivite coincidiu com o início do quadro neurológico e com o lado da inoculação do vírus na cavidade nasal. Em poucos animais foi possível observar uma alteração de comportamento, geralmente relacionada com acentuada agitação e agressividade, que também coincidiu com o 5<sup>o</sup>. ao 6<sup>o</sup>. dias p.i. Após houve evolução para o quadro de paralisia de posteriores seguido de convulsões.

Um animal do grupo G7 foi encontrado morto na caixa no 5<sup>o</sup> dia p.i. e seu cérebro foi colhido para exame das alterações neurológicas. Os camundongos da linhagem B6 (G7) iniciaram os sinais clínicos no 5<sup>o</sup>. dia p.i. Os camundongos B6 (G6), tiveram um período de evolução mais prolongado e iniciaram os sintomas no 6<sup>o</sup>. dia p.i. Os animais dos grupos controle (G4 e G5) não apresentaram sintomas neurológicos.

### **4.2 Análise em microscopia de luz**

#### **4.2.1 Histopatologia**

Pela análise das alterações histopatológicas dos encéfalos dos grupos infectados, foi possível observar que as lesões multifocais a localmente extensas, estendiam-se desde o bulbo olfatório até o tronco cerebral. Houve predominância de processos degenerativos (necrose/+++), presença de infiltrado inflamatório misto (células mononucleares e neutrófilos) nas meninges (++) e manguitos perivasculares (+) evidentes na região do tálamo e hipotálamo. Neurônios apresentaram necrose (+++), caracterizada por picnose nuclear e citoplasma acidofílico e retraído, porém foram raros os focos de neuroniofagia. As alterações neuronais foram mais evidentes da região do infundíbulo hipofisário até o tronco cerebral. Nos vasos sanguíneos do tálamo e hipotálamo e, com menor frequência no tronco cerebral, verificou-se a presença de debris celulares, característicos de apoptose e sempre associados ao neurópio perivascular. A meningite descrita, sempre foi segmentar ou focal, associada invariavelmente aos locais que apresentavam lesões degenerativas.

Os grupos experimentais apresentaram especificamente as seguintes lesões:

**- Grupo 1 (Swiss, 2 dias p.i.)**

Nos animais do grupo G1, as lesões foram discretas e corresponderam a necrose focal no bulbo olfatório (+), geralmente unilateral (Figura 3A). Observou-se meningite focal e discreta, presente no bulbo olfatório, infundíbulo hipofisário e tronco cerebral. O infiltrado presente era composto predominantemente por neutrófilos e alguns linfócitos. No sistema ventricular, principalmente nos ventrículos laterais, verificou-se infiltrado mononuclear (+) em região subependimária (Figura 3F). Esporadicamente notou-se infiltrado inflamatório na fissura rinal (+). Necrose neuronal focal (+) foi observada no bulbo olfatório, no hipotálamo adjacente ao 3º. ventrículo e na ponte próxima ao 4º. ventrículo.

Em alguns animais foi observada gliose focal (+) em região do quiasma óptico, geralmente associada ao córtex cerebral (Figura 3B).

**- Grupo 2 (Swiss, 4 dias p.i.)**

As lesões necróticas observadas neste grupo foram mais extensas (++). Em dois animais do grupo, a necrose estendeu-se do bulbo olfatório até o hipotálamo, abrangendo o corpo caloso e o hipocampo. O padrão das lesões foi o mesmo de G1, porém com maior intensidade, principalmente da necrose. Houve também gliose focal cortical em quiasma óptico (+), ventriculite (++) em ventrículo lateral e quarto ventrículo, com vacuolização do citoplasma de células endoteliais do plexo coróide (+). A necrose do bulbo olfatório foi unilateral e focal (++) . O infiltrado meningeal subagudo foi focal (+) em bulbo olfatório, infundíbulo hipofisário e tronco cerebral.

**- Grupo 3 (Swiss, 5 a 6 dias p.i.)**

As áreas de necrose foram mais extensas neste grupo. Dois animais apresentaram necrose (+++), que estendeu-se do bulbo olfatório até o quiasma óptico. No hipotálamo (Figura 3C), verificou-se além de necrose neuronal (++) , a presença de debris celulares (++) no neurópilo, adjacente aos vasos, os quais apresentavam manguitos perivasculares mistos (+). O neurópilo, nas áreas com necrose celular isquêmica, apresentava microvacuolização. Os debris celulares predominavam no tálamo e hipotálamo próximo ao 3º. ventrículo. Alguns animais apresentaram necrose focal do giro do hipocampo (Figura 4A). A gliose focal (+) estava presente novamente no córtex do quiasma óptico e estava associada a necrose focal de neurônios. Meningite focal e ventriculite moderada (++) em ventrículos laterais, 3º. e 4º. ventrículos, estavam associadas a vacuolização do citoplasma endotelial do plexo coróide (++) , que também apresentava leucócitos dentro do lúmen vascular.

Um camundongo do grupo apresentou necrose focal na região do pedúnculo cerebelar, associada à vacuolização do parênquima.

**- Grupo 6 (C57BL/6 IL-4 -/-, 5 a 6 dias p.i.)**

Nos animais desta linhagem, as lesões foram mais extensas que os grupos G3 e G7. Invariavelmente foram observadas áreas de necrose focais a

difusas (+++) em ambos os bulbos olfatórios. Associado a estas lesões degenerativas, verificou-se a presença de evidente hipertrofia astrocitária (++), focos de meningite (++) e manguitos perivasculares (+) com infiltrado misto (leucócitos mononucleares e polimorfonucleares). As lesões necróticas da região do infundíbulo hipofisário (tálamo e hipotálamo) foram extensas (+++) e sempre adjacentes aos ventrículos laterais e ao terceiro ventrículo. Estas lesões tiveram como principal aspecto necrose neuronal, microvacuolização do neurópilo, manguitos perivasculares discretos associados sempre a debris celulares (Figura 5A). Na região subependimária dos ventrículos foi uma constante a presença de infiltrado inflamatório (++) e também a vacuolização do citoplasma da célula endotelial do plexo coróide (++) . A reação astrocitária (hipertrofia nuclear) no corpo caloso e região periventricular foi bastante evidente (++) . No tronco cerebral a necrose neuronal (+++) associada a manguitos perivasculares (+) e debris celulares (+++) foi uma constante neste grupo. Um animal apresentou necrose (++) em células do giro dentato e giro do hipocampo. Outro animal apresentou necrose focal de células de Purkinge do cerebelo. Os segmentos das leptomeninges com infiltrado misto (++) apareceram também nas regiões hipotalâmica e do tronco cerebral.

#### **- Grupo 7 (C57BL/6, 5 a 6 dias p.i.)**

Os animais deste grupo apresentaram lesões mais intensas que os da linhagem Swiss (G3), porém menos intensas que os do grupo G6. O tipo e a distribuição das lesões inflamatórias foi o mesmo de G6, porém com intensidade diferente (++) no que diz respeito aos processos necróticos, que neste grupo foram muito mais intensos no infundíbulo hipofisário e tronco cerebral. Os debris celulares em região talâmica (++) foram um aspecto marcante da necrose neste grupo (Figura 3D). O camundongo que foi encontrado morto na caixa e que não foi perfundido, apresentou algumas lesões mais intensas que os demais deste grupo. O padrão de alterações histológicas foi o mesmo dos demais, no bulbo olfatório, infundíbulo hipofisário, tronco cerebral (Figura 3E), porém a gliose difusa, a congestão vascular e o infiltrado linfocitário difuso no neurópilo foram

muito evidentes neste animal. Notou-se também uma discreta a moderada satelitose e neuroniofagia. Este animal também apresentou necrose extensa de neurônios do hipocampo.

#### - Grupos 4 e 5 (Swiss e B6, controles)

Os animais destes grupos não apresentaram lesões microscópicas no neurópilo, pela análise dos cortes de cérebro corados pela técnica de H&E. Na Tabela 6 apresenta-se um resumo da distribuição e intensidade das lesões nos grupos experimentais em estudo.

TABELA 6 – Distribuição e intensidade das lesões microscópicas na encefalite por VEV, nos diferentes grupos e áreas.

| GRUPOS    | TIPO DE LESÃO | ÁREAS       |         |    |       |     |
|-----------|---------------|-------------|---------|----|-------|-----|
|           |               | BO<br>VENTR | TA/HIPO | HC | TR    | MEN |
| G1 (S2)*  | necrose       | +           |         | +  |       |     |
|           | inflamação    |             |         |    | +     | +   |
| G2 (S4)*  | necrose       | ++          | ++      |    |       |     |
|           | inflamação    |             |         |    | +(+)  | ++  |
| G3 (S5)*  | necrose       | +++         | ++(+)*  |    |       |     |
|           | inflamação    |             |         |    | ++    | ++  |
| G6 (KO5)* | necrose       | +++         | +++*    | ++ | +++*  |     |
|           | inflamação    |             |         |    | ++    | ++  |
| G7 (C5)*  | necrose       | ++(+)       | ++(+)*  | ++ | ++(+) |     |
|           | inflamação    |             |         |    | ++    | ++  |

BO = bulbo olfatório; TA/HIPO = tálamo / hipotálamo; HC = hipocampo; TR = tronco cerebral; MEN = meninges; VENTR = ventrículos (lateral, terceiro, quarto); + = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; ++(+)= moderada a acentuada; +(+) = discreta a moderada; \* Associada a debris celulares. \* S = Swiss; KO= "knockout" IL-4; C = C57BL/6; 2,4,5 = 2 ou 4 ou 5-6 dias p.i.

#### 4.2.2 Imunoistoquímica

Os cérebros submetidos a coloração imunoistoquímica apresentaram as seguintes alterações:

#### 4.2.2.1 Imunomarcação para o VEV

As células que apresentaram marcação citoplasmática positiva para o VEV, foram predominantemente neurônios íntegros ou em degeneração, principalmente nas regiões do tálamo, hipotálamo e tronco cerebral (+++). A marcação foi mais discreta no hipocampo e quiasma óptico (+ a ++), sempre associada a necrose (Figura 4C). Foram observadas raríssimas células positivas no bulbo olfatório (+). Verificou-se a presença de algumas células VEV positivas no infiltrado inflamatório periventricular e da fissura rinal (+). No grupo 1 a marcação foi bastante discreta, restrita a algumas células do bulbo olfatório e do tronco cerebral.

No grupo 2 verificou-se marcação mais intensa de células VEV positivas, localizadas na fissura rinal (+), córtex do quiasma óptico (+), hipotálamo (+), no corpo caloso e no hipocampo necróticos (++) e no tronco cerebral (++) . Um animal do grupo apresentou um número maior de células positivas (+++) do infundíbulo hipofisário até a ponte. Raras células positivas no infiltrado subependimário do ventrículo lateral.

No grupo 3 a imunomarcação foi mais forte, observando-se mais células coradas, predominantemente no tálamo e hipotálamo (++) , mesencéfalo e tronco cerebral (+++), sempre associadas a necrose. Raros neurônios positivos no bulbo olfatório (+), infiltrado inflamatório subependimal do ventrículo lateral (+) e em neurônios degenerados associados a gliose focal do córtex cerebral. No hipocampo a presença de células VEV positivas foi vista no giro dentato e no giro do hipocampo, associadas ou não a necrose.

Nos grupos 4 e 5 a imunomarcação para o VEV foi negativa em todos os animais. No grupo 6 houve uma marcação significativa (+++) no tálamo e hipotálamo associada a áreas de necrose (Figura 5B). No tronco cerebral a marcação (+++) foi forte em alguns neurônios e mais fraca em outros que apresentavam necrose. O bulbo olfatório foi discretamente positivo (+), bem como o infiltrado subependimário do ventrículo lateral (+).

No grupo 7 a presença de células positivas foi elevada, com um padrão de distribuição nas áreas anatômicas similar aos grupos 3 e 6. A presença do

vírus foi observada no bulbo olfatório (+), tálamo e hipotálamo com focos necróticos (++), em neurônios do hipocampo (giro dentato e giro do hipocampo) e do córtex adjacente (+++), no mesencéfalo necrótico (++) e tronco cerebral (++) / Figura 4D). Discreta presença de células positivas na meningite focal do hipotálamo e no infiltrado inflamatório adjacente ao ventrículo lateral. Um animal apresentou imunomarcagem para o vírus em células de Purkinje do cerebelo. No animal não perfundido, a presença de células positivas foi maior no tronco cerebral (++) , mesencéfalo (++) e hipotálamo (++) . Houve diferença na intensidade da imunomarcagem em neurônios íntegros ou em degeneração (mais fraca). Discreta marcação no infiltrado da ventriculite lateral.

#### **4.2.2.2 Imunomarcagem para astrócitos**

As áreas do SNC, que apresentaram marcação positiva mais evidente para GFAP, foram o bulbo olfatório, o corpo caloso, o hipocampo, o tálamo e em menor proporção o mesencéfalo e tronco cerebral. Também foi observada a imunomarcagem para GFAP em astrócitos perivascular e abaixo da meninge. O aspecto morfológico dos astrócitos, em animais normais, correspondeu a núcleos arredondados à discretamente ovalados, hipocromáticos, com a cromatina homogeneamente distribuída e com os prolongamentos longos e evidentes. Nos animais infectados este padrão alterou-se para astrocitose reativa, caracterizada pelo aumento do volume nuclear (hipertrofia) e espessamento dos prolongamentos citoplasmáticos, nas áreas adjacentes à necrose. Nos focos necróticos houve redução do número de astrócitos, com diminuição do volume nuclear e com processos citoplasmáticos fragmentados ou ausentes, com bordas pouco definidas. Nas diferentes áreas dos grupos experimentais verificou-se as seguintes alterações:

No grupo 1 todas as áreas apresentavam astrócitos preservados. No bulbo olfatório (Figura 4E), fissura rinal, corpo caloso e hipocampo observou-se uma menor concentração de células positivas, em um animal. Nas áreas focais de necrose do bulbo olfatório, observou-se a presença de células positivas apenas na periferia da lesão (Figura 4F). Os focos de gliose do córtex (quiasma

óptico), em um animal, foram GFAP negativos e nos demais a imunomarcação foi discreta, com pouquíssimas células com prolongamentos marcados.

No grupo 2 observou-se áreas de necrose mais evidentes, do bulbo olfatório ao hipocampo. O número de astrócitos positivos dentro destes locais foi menor. Os astrócitos apresentavam prolongamentos mais curtos e fragmentados. As áreas de gliose focal foram GFAP negativas.

No grupo 3, observou-se o mesmo aspecto morfológico dos astrócitos do grupo 2, quando presentes nas áreas necróticas do bulbo olfatório, hipocampo (Figura 4B), corpo caloso, tálamo, hipotálamo e mesencéfalo. Na periferia das lesões degenerativas houve astrocitose reativa e presença de alguns astrócitos binucleados. A gliose também foi GFAP negativa neste grupo.

Nos grupos 4 e 5 houve uniformidade na morfologia astrocitária, tanto do núcleo como dos prolongamentos (mais longos e evidentes), em todas as áreas estudadas. Nos grupos 6 e 7, as células gliais positivas apresentavam padrão de astrocitose reativa mais evidente que o grupo 3, sempre nas áreas adjacentes a necrose ou em áreas não lesadas. Nos focos necróticos notou-se severa fragmentação dos processos citoplasmáticos dos astrócitos, associada a picnose nuclear em alguns casos. Houve desaparecimento destas células nos focos necróticos. No infiltrado subependimário do ventrículo lateral verificou-se a presença de células positivas (+). Foram observados astrócitos binucleados (++), principalmente no hipocampo, corpo caloso e tronco cerebral.

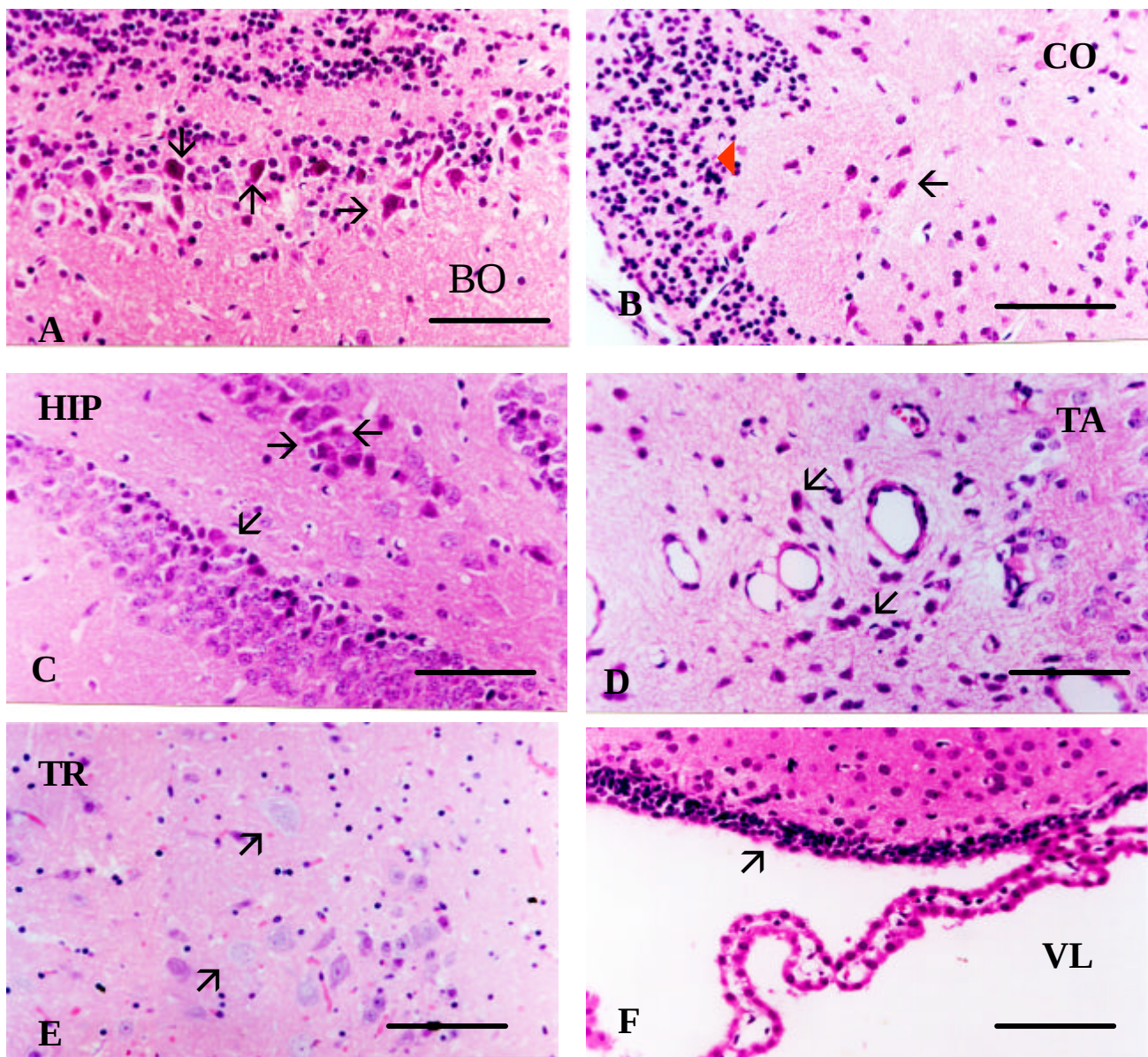
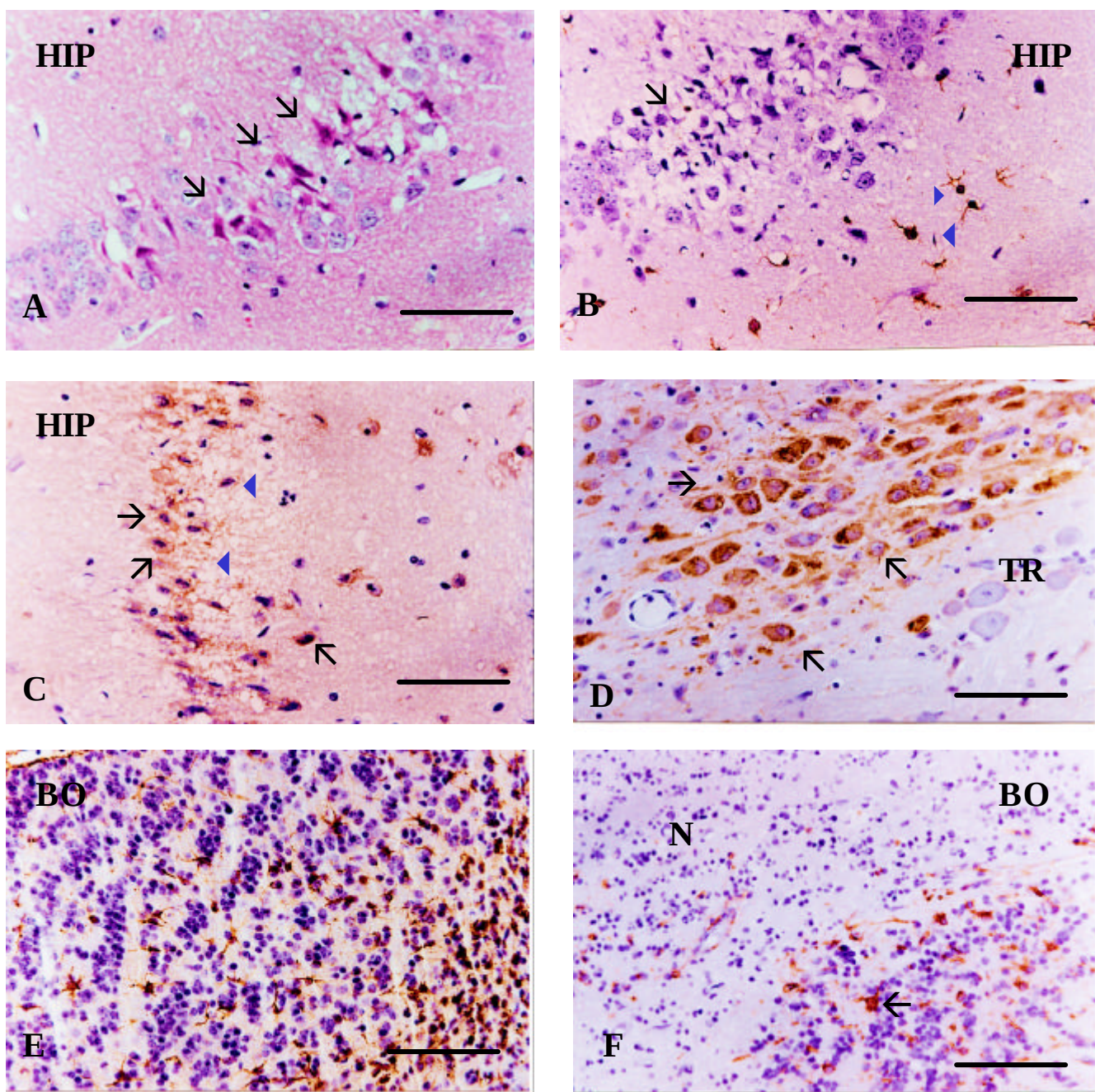


FIGURA 3 - Fotomicrografias de cérebros de camundongos infectados pelo VEV. (A) Necrose neuronal (setas) em bulbo olfatório (BO) de G1; (B) Gliose (cabeça de seta vermelha) em córtex (CO) com necrose (seta), G1; (C) Necrose neuronal (setas) no hipocampo (HIP), G3; (D) Tálamo (TA) com necrose (setas), G7; (E) Necrose neuronal (setas) no tronco cerebral (TR), G7; (F) Ventriculite (seta) (ventrículo lateral - VL) em G1. Técnica de Hematoxilina & Eosina. Barra = 25μm.



**FIGURA 4** - Fotomicrografias da sequência de lesões microscópicas no cérebro de camundongos inoculados com VEV, em H&E e Imunoistoquímica (IH). (A) Necrose neuronal (setas) no hipocampo (HIP) - (G3 / H&E); (B) Necrose (seta) hipocampal (HIP) com lesão astrocitária (cabeças de seta azul) - (G3 / IH GFAP); (C) Necrose (cabeças de seta azul) hipocampal (HIP) com neurônios positivos (setas) para VEV (G3 / IH VEV); (D) Tronco cerebral (TR) com presença do vírus (setas) - (G7 / IH VEV); (E) Bulbo Olfatório (BO) com astrócitos íntegros (G1 / IH GFAP). (F) Bulbo Olfatório (BO) com foco necrótico (N) e astrocitose reativa na periferia (seta) (G6 / GFAP). Barra = 25µm.

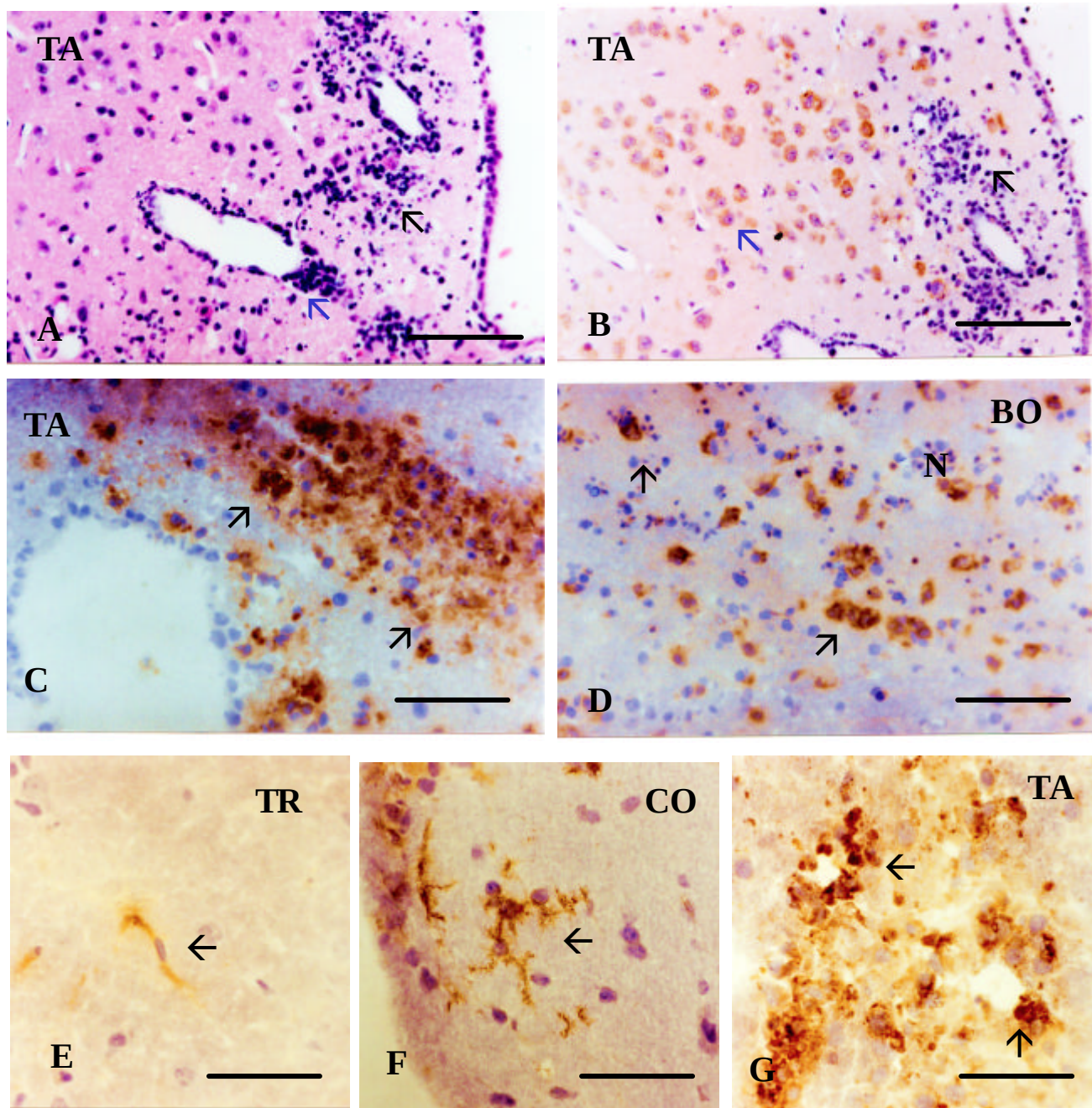


FIGURA 5 - Fotomicrografias de lesões seqüenciais em camundongos com encefalite por VEV. (A) Tálamo (TA) com manguitos perivasculares (seta azul) e debris celulares (seta) - (G6 / H&E); (B) Mesma lesão de A, com presença do vírus (seta azul) associado aos debris celulares (seta) - (G6 / IH VEV); (C) Lesão similar a A e B, com presença da microglia (setas) - (G6 / IH OX-42); (D) Bulbo (BO) com necrose (N) com microglia fagocítica (setas) - (G3 / IH OX-42); (E) Microglia bipolar (seta) no tronco cerebral (TR); (F) Microglia ramificada (seta) no córtex (CO); (G) Microglia fagocítica (setas) no tálamo (TA) - (E-G G6 / IH OX-42); Barra = 25µm.

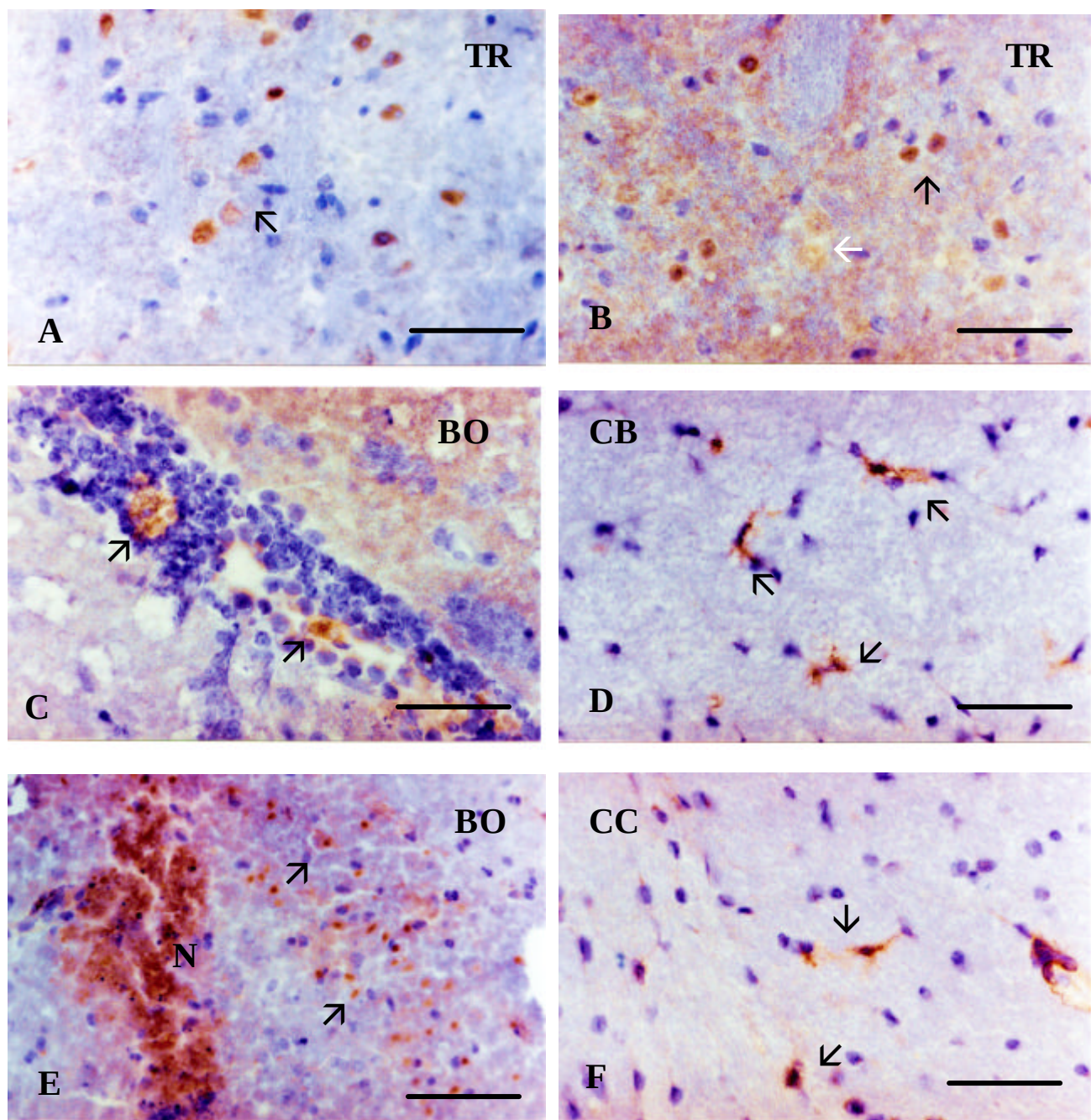


FIGURA 6 - Fotomicrografias da imunomarcação para MIP-1 $\alpha$  e MIP-1  $\beta$  na encefalite murina por VEV . (A) Tronco cerebral (TR) com células positivas para MIP-1 $\alpha$  (G3); (B) Tronco cerebral (TR) com neurônios positivos (seta branca) e astrócitos (seta) - (G6); (C) Células positivas para MIP-1  $\alpha$  (seta) no infiltrado do bulbo olfatório (BO); (D) Células MIP-1 $\alpha$  positivas (seta), semelhantes a microglia, no cerebelo (CC) - (G7); (E) Bulbo olfatório (BO) com necrose (N) e células MIP-1 $\beta$  positivas (setas) na periferia (G7); (F) Corpo Caloso (CC) com células fusiformes (microglia) positivas (setas) para MIP-1  $\beta$  (G7). Barra = 25 $\mu$ m.

#### 4.2.2.3 Imunomarcção para as b-quimiocinas

##### a) MIP-1 $\alpha$

A marcação positiva para esta quimiocina foi verificada em cortes de congelação. Os planos de corte horizontal dos cérebros apresentaram muita variação e por isso foi difícil padronizar as áreas imunomarcadas. Em todos os grupos foi significativa a presença de células positivas no mesencéfalo e ponte. Nas demais áreas a imunomarcção para MIP-1 $\alpha$  foi mais fraca (+) e ocorreu com maior frequência nas regiões do hipocampo, tálamo e hipotálamo.

As células positivas para esta quimiocina, no tronco cerebral, apresentaram morfologia variada. O aspecto mais frequente foi de células arredondadas a ovaladas semelhantes a astrócitos (Figura 6A-B), com imunomarcção marrom-escuro (+++). Apareceram também algumas células mais alongadas e menores que as primeiras sugestivas de microglia, com marcação similar. Um terceiro tipo celular, apresentou um volume maior que as anteriores, com uma marcação mais fraca (amarelo-ouro) e em número menor que as outras (neurônios / Figura 6B). A intensidade da imunomarcção variou bastante entre as células positivas no mesmo animal. Foram vistas algumas células inflamatórias das meninges e ventrículos positivas para MIP-1 $\alpha$  (Figura 6C). Dos grupos infectados, observou-se apenas uma marcação mais fraca em G6 e em menor proporção G7. Nos grupos controle (G4 e G5) a intensidade de coloração das células positivas foi moderada em relação aos grupos G1, G2 e G3. Algumas células com núcleo alongado e citoplasma bipolar discretamente ramificado, foram vistas no cerebelo e foram positivas para MIP-1 $\alpha$  e com uma morfologia sugestiva da microglia ramificada (Figura 6D).

##### b) MIP-1 $\beta$

Nos grupos G1 e G2, apenas poucas células inflamatórias do infiltrado meningeal e do ventrículo lateral, apresentaram marcação positiva. No grupo 3 foram observadas células positivas (++) no tronco cerebral. Nos grupos 4 e 5 não foi verificada imunomarcação. Nos grupos 6 e 7, a presença de células positivas (+) foi vista no núcleo olfatório, adjacente ao bulbo necrótico (Figura 6E). No bulbo olfatório verificou-se, na periferia das áreas necróticas, a presença de células positivas, com citoplasma arredondado e fortemente marcado, semelhante a microglia fagocítica. As mesmas células foram vistas circundando uma área necrótica do tronco cerebral de um animal (G6). Células com morfologia ramificada foram vistas na substância branca, próximas ao hipocampo e região ventricular (Figura 6F), com aspecto sugestivo de microglia ramificada.

#### **4.2.2.4 Imunomarcação para microglia**

Nos cérebros estudados notou-se grande variação morfológica das células positivas. A morfologia variou desde fusiforme (bipolar, não reativa / Figura 5E), para ramificada com prolongamentos mais finos (não reativa / Figura 5F) a células com prolongamentos espessados (reativa) até formas arredondadas e sempre associadas a necrose (fagocítica / Figura 5G). O número de células positivas diferiu entre os grupos experimentais. No grupo G1 verificou-se pouquíssimas células positivas no córtex cerebral, com predominância da forma bipolar.

No grupo 2 notou-se células fusiformes a ramificadas (substância branca) no tronco cerebral, corpo caloso e tecido adjacente ao ventrículo lateral. No bulbo olfatório necrótico foram evidentes as células arredondadas fagocíticas. No tecido circunvizinho ao bulbo olfatório foram vistas células microgliais ativadas com processos citoplasmáticos ramificados. As células inflamatórias da fissura rinal e ventrículo lateral foram positivas (+) para o anticorpo anti-microglia.

No grupo 3 o número de células fusiformes aumentou em todo o cérebro (substância branca do cerebelo, hipocampo, hipotálamo e tronco cerebral). Nos bulbos e no tronco cerebral, com lesão, observou-se células arredondadas na periferia das áreas de necrose. Células microgliais reativas, com prolongamentos citoplasmáticos espessados e com núcleo alongado hipertrófico, foram vistas na vizinhança da área necrótica do tronco cerebral.

Nos grupos controle, o padrão microglial predominante foi fusiforme, desde o bulbo olfatório até o tronco cerebral, com menor densidade que os grupos infectados. Nos grupos 6 e 7, o número de células microgliais positivas foi maior que de G3. O padrão de distribuição foi o mesmo de G3, ou seja, células arredondadas a ramificadas reativas associadas a necrose, fusiformes em áreas distantes da lesão e ramificadas (não-reativas) na substância branca cerebelar e do corpo caloso. Nestes grupos haviam mais focos necróticos no bulbo, tálamo, hipotálamo e tronco cerebral (Figura 5C-D). Foram vistas células positivas nos manguitos perivasculares do tálamo e tronco cerebral. Na Tabela 7 mostra-se um resumo das intensidades da imunomarcação para VEV, GFAP, microglia e  $\beta$ -quimiocinas nos grupos infectados e controles.

TABELA 7 – Intensidade da reação positiva para as imunoistoquímicas testadas na encefalite experimental pelo vírus da estomatite vesicular, dentro dos grupos experimentais.

| GRUPOS | VEV     | GFAP | MIP-1 $\alpha$ | MIP-1 $\beta$ | MICROGLIA |
|--------|---------|------|----------------|---------------|-----------|
| G1     | +       | +++  | ++             | -             | (+)       |
| G2     | ++      | ++   | ++             | -             | +(++)     |
| G3     | +++     | ++   | +++            | +             | ++        |
| G4     | -       | +++  | +(++)          | -             | +         |
| G5     | -       | +++  | +(++)          | -             | +         |
| G6     | ++(+++) | ++   | +(++)          | ++            | +++       |
| G7     | ++(+++) | ++   | +(++)          | ++            | +++       |

(+) Discretíssimo; + discreto; ++(++) discreto a moderado; ++ moderado; ++(+++) moderado a acentuado; +++ acentuado. (GFAP) proteína glial fibrilar ácida de astrócitos; (MIP-1 $\alpha$  e  $\beta$ ) proteína inflamatória de macrófagos alfa e beta; (VEV) vírus da estomatite vesicular.

### 4.3 Densidade Celular e Morfometria

#### 4.3.1 Diâmetro de Astrócitos

As médias gerais observadas, o número de informações e os coeficientes de variação para o diâmetro de astrócitos, por grupo (1 a 7) e por área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) são relacionados em anexo, respectivamente, nas Tabelas 1A e 2A. Na Tabela 3A, em anexo, relatam-se as médias observadas e o número de informações para a característica estudada, por grupo (1 a 7), em cada uma das mesmas áreas.

Para a análise estatística, considerou-se 12 animais, pertencentes aos grupos 3 a 5 e foram obtidas 2496 informações de diâmetro de astrócitos. A média geral observada para essa característica foi  $5,8535 \pm 0,8600 \text{ mm}$ , com um coeficiente de variação de 14,69%. O resumo da análise de variância do diâmetro de astrócitos, considerando as fontes de variação de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área é descrito na Tabela 8. Observa-se que o efeito de grupo, quando testado pelo quadrado médio do efeito de animal dentro de grupo como resíduo, não influenciou significativamente a característica em estudo (Tabela 8). Considerou-se que as diferenças entre animais dentro de grupo seriam uma importante causa de variação ( $P < 0,0001$ ) entre os grupos. Verificaram-se diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) entre as medidas de diâmetro de astrócitos nas diferentes áreas. A interação significativa ( $P < 0,0001$ ) entre grupo e área indicou diferentes respostas por área em grupos distintos.

Na Tabela 9, relatam-se as médias estimadas para a característica estudada, a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área. Esses valores são representados na Figura 7. Em todas as áreas, as maiores médias incluíram o grupo 5, que diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) do grupo 4 nas quatro áreas

estudadas e, em relação ao grupo 3, apenas na área de bulbo olfatório. Os grupos 3 e 4 não tiveram diferenças significativas, exceto na área do hipocampo.

TABELA 8. Resumo da análise de variância para o diâmetro de astrócitos, considerando os efeitos de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área.

| Fonte de variação      | Graus de liberdade | Quadrado Médio      |
|------------------------|--------------------|---------------------|
| Grupo <sup>1</sup>     | 2                  | 37,60 <sup>ns</sup> |
| Animal (Grupo)         | 9                  | 13,81 <sup>*</sup>  |
| Área                   | 3                  | 20,80 <sup>*</sup>  |
| Interação Grupo x Área | 6                  | 4,86 <sup>*</sup>   |
| Resíduo                | 2475               | 0,62                |

<sup>ns</sup>Não significativo; <sup>\*</sup>(P < 0,0001); Coeficiente de Determinação (R<sup>2</sup>) = 16,07%

<sup>1</sup>Teste de Hipótese para o efeito de grupo, utilizando o quadrado médio de animal dentro de grupo como resíduo

TABELA 9. Médias estimadas e respectivos erros-padrão para o diâmetro de astrócitos por grupo (3 a 5) em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área.

| Grupo | Área (mm)                  |                            |                             |                             |
|-------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|       | BO                         | HC                         | TC                          | CC                          |
| 3     | 5,4054±0,0542 <sup>b</sup> | 6,1243±0,0555 <sup>a</sup> | 5,9429±0,0561 <sup>ab</sup> | 5,8079±0,0530 <sup>ab</sup> |
| 4     | 5,3305±0,0537 <sup>b</sup> | 5,8510±0,0536 <sup>b</sup> | 5,8555±0,0540 <sup>b</sup>  | 5,6334±0,0547 <sup>b</sup>  |
| 5     | 6,1231±0,0654 <sup>a</sup> | 6,1233±0,0543 <sup>a</sup> | 6,1536±0,0546 <sup>a</sup>  | 5,9854±0,0540 <sup>a</sup>  |

Médias seguidas por letras distintas em cada área diferem significativamente (P < 0,05) pelo Teste Tukey.

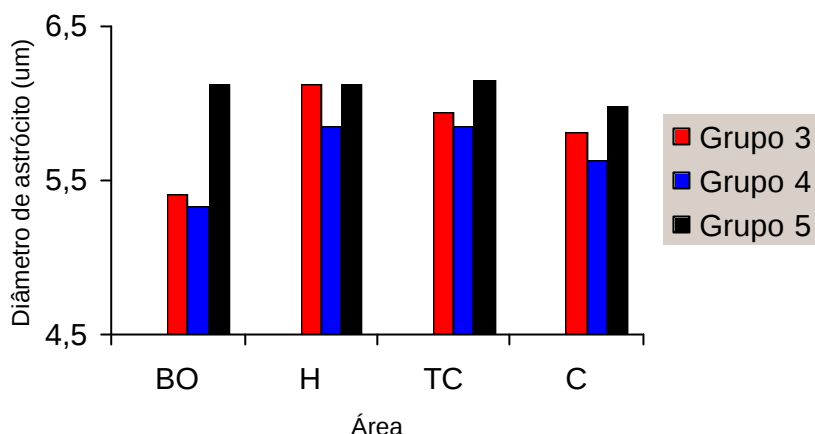


FIGURA 7. Médias estimadas do diâmetro de astrócitos ( $mm$ ) por Grupo (3 a 5) em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área.

#### 4.3.2 Densidade de Astrócitos

As médias gerais observadas, o número de informações e os coeficientes de variação para a densidade de astrócitos, por grupo (1 a 7) e por área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) são relacionados em anexo, respectivamente, nas Tabelas 4A e 5A. As médias observadas e o número de informações para a densidade de astrócitos por grupo (1 a 7) em cada uma das mesmas áreas são indicadas em anexo (Tabela 6A).

Nas análises estatísticas, a densidade de astrócitos foi observada em 12 animais, oriundos dos grupos 3 a 5, totalizando 1379 informações. A média geral observada para essa característica foi  $18,27 \pm 8,46$ , com um coeficiente de variação de 46,30%. Para adequar a distribuição da característica à Distribuição Normal de Gauss, a densidade de astrócitos ( $x$ ) foi transformada em raiz quadrada ( $\sqrt{x}$ ). O resumo da análise de variância da raiz quadrada da densidade de astrócitos, considerando as fontes de variação de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área é relacionado na Tabela 10.

TABELA 10. Resumo da análise de variância para a raiz quadrada da densidade de astrócitos, considerando os efeitos de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área.

| Fonte de variação      | Graus de liberdade | Quadrado Médio     |
|------------------------|--------------------|--------------------|
| Grupo <sup>1</sup>     | 2                  | 6,50 <sup>ns</sup> |
| Animal (Grupo)         | 9                  | 15,36 <sup>*</sup> |
| Área                   | 3                  | 68,02 <sup>*</sup> |
| Interação Grupo x Área | 6                  | 5,76 <sup>*</sup>  |
| Resíduo                | 1358               | 0,66               |

<sup>ns</sup>Não significativo; <sup>\*</sup>( $P < 0,0001$ ); Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) = 30,76%; Coeficiente de Variação (CV) = 19,51%; <sup>1</sup>Teste de Hipótese para o efeito de grupo, utilizando o quadrado médio de animal dentro de grupo como resíduo

Verificou-se, pela Tabela 10, um efeito não significativo de grupo sobre a característica em estudo, quando o resíduo foi o quadrado médio do efeito de animal dentro de grupo. Por esse resultado, indica-se a maior importância da variação existente entre os indivíduos dentro de cada grupo ( $P < 0,0001$ ) do que aquela entre os grupos. O efeito de área sobre a característica foi significativo ( $P < 0,0001$ ), assim como a interação entre grupo e área ( $P < 0,0001$ ), o que corresponde, respectivamente, a diferenças significativas entre as áreas e diferentes desempenhos dos grupos estudados conforme a área.

As médias estimadas (Tabela 11) para a densidade de astrócitos, por grupo (3 a 5), em cada área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) foram obtidas considerando, no modelo proposto, os efeitos fixos de grupo (3 a 5), animal dentro de grupo, área (bulbo olfatório, hipocampo, tronco cerebral e corpo caloso) e a interação entre grupo e área e são representadas na Figura 8. Não houve diferenças significativas entre os grupos nas áreas de hipocampo e corpo caloso. Na área do bulbo olfatório, a maior média foi verificada no grupo 5, diferente significativamente ( $P < 0,05$ ) dos demais. O grupo 3 teve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) em relação aos grupos 4 e 5 na área do tronco cerebral.

TABELA 11. Médias estimadas e respectivos erros-padrão para a densidade de astrócitos por grupo (3 a 5) em cada área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área.

| Grupo | Área                    |                         |                         |                         |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|       | BO                      | HC                      | TC                      | CC                      |
| 3     | 15,04±0,31 <sup>b</sup> | 20,21±0,33 <sup>a</sup> | 15,82±0,29 <sup>a</sup> | 21,91±0,34 <sup>a</sup> |
| 4     | 15,49±0,30 <sup>b</sup> | 18,59±0,32 <sup>a</sup> | 10,49±0,24 <sup>b</sup> | 21,27±0,35 <sup>a</sup> |
| 5     | 18,79±0,39 <sup>a</sup> | 18,30±0,32 <sup>a</sup> | 12,71±0,26 <sup>b</sup> | 20,47±0,33 <sup>a</sup> |

Médias seguidas por letras distintas em cada área diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo Teste Tukey.

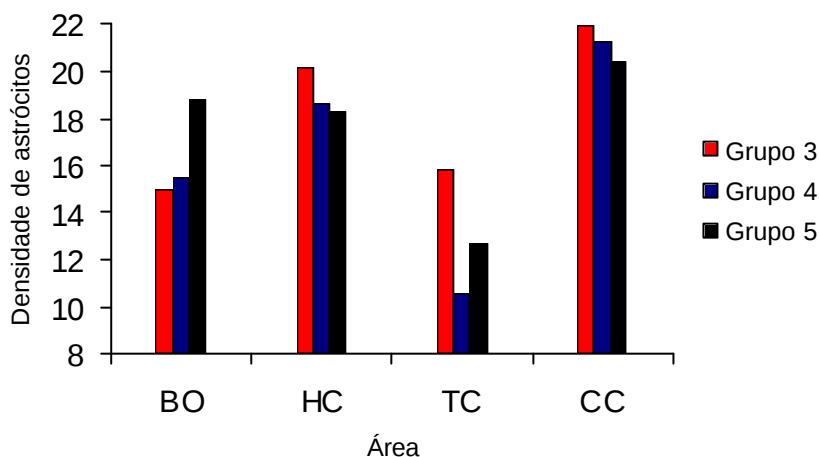


FIGURA 8. Médias estimadas de densidade de astrócitos por Grupo (3 a 5), em cada Área (bulbo olfatório = BO, hipocampo = HC, tronco cerebral = TC e corpo caloso = CC), a partir do modelo matemático proposto, considerando os efeitos fixos de grupo, animal dentro de grupo, área e a interação entre grupo e área.

#### 4.3.3 Densidade de células positivas para a Quimiocina MIP-1 $\alpha$

As médias gerais observadas, o número de informações e os coeficientes de variação para a densidade de células MIP-1 $\alpha$  positivas, por grupo (1 a 7) são descritos na Tabela 7A, em anexo.

Na análise estatística, a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$  foi avaliada a partir de 298 informações provenientes de 10 animais, pertencentes aos grupos 3 a 5. A média geral observada para essa característica foi  $20,33 \pm 9,54$ , com um coeficiente de variação de 46,92%. Para

adequá-la à Distribuição Normal de Gauss, a característica ( $x$ ) foi transformada em raiz quadrada ( $\sqrt{x}$ ). O resumo da análise de variância da raiz quadrada da densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , considerando a fonte de variação de grupo (3 a 5) e de animal dentro de grupo, é indicado na Tabela 12. Constatou-se que o efeito de grupo foi significativo ( $P < 0,01$ ) sobre a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , quando o teste de hipótese foi feito utilizando o quadrado médio do efeito de animal dentro de grupo como resíduo. A variação provocada pelas diferenças entre indivíduos do mesmo grupo também foi significativa sobre a característica estudada. As médias gerais estimadas e respectivos erros-padrão por grupo (3 a 5) para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , a partir do modelo matemático proposto, que incluiu os efeitos fixos de grupo e de animal dentro de grupo são relacionadas na Tabela 13 e indicadas na Figura 9.

As maiores médias para as células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$  foram verificadas nos grupos 3 e 4 (Tabela 13), que não diferiram significativamente entre si, mas que tiveram diferenças significativas em relação ao grupo 5.

TABELA 12. Resumo da análise de variância para a raiz quadrada da densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , considerando o efeito de grupo (3 a 5) e de animal dentro de grupo.

| Fonte de variação  | Graus de liberdade | Quadrado Médio |
|--------------------|--------------------|----------------|
| Grupo <sup>1</sup> | 2                  | 18,92*         |
| Animal (Grupo)     | 7                  | 3,02*          |
| Resíduo            | 288                | 0,74           |

\* ( $P < 0,01$ ); Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) = 38,66%; Coeficiente de Variação (CV) = 19,69 %; <sup>1</sup>Teste de Hipótese para o efeito de grupo, utilizando o quadrado médio de animal dentro de grupo como resíduo

TABELA 13. Médias gerais estimadas e respectivos erros-padrão por grupo (3 a 5) para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , a partir do modelo matemático proposto, que incluiu os efeitos fixos de grupo e de animal dentro de grupo.

| Grupo | Média $\pm$ Erro-padrão       | CV (%) |
|-------|-------------------------------|--------|
| 3     | 22,10 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup> | 1,69   |
| 4     | 21,92 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup> | 1,68   |
| 5     | 9,91 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>  | 3,53   |

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente (P<0,05) pelo Teste Tukey.

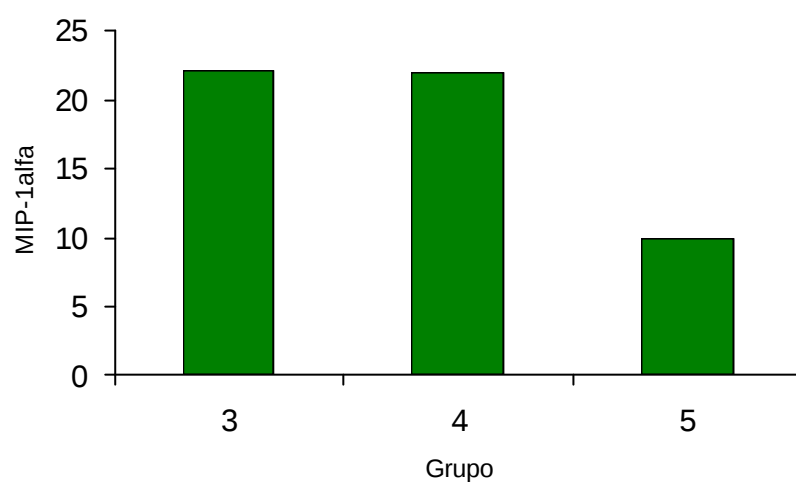


FIGURA 9. Médias gerais estimadas por grupo (3 a 5) para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ , a partir do modelo matemático proposto, que incluiu os efeitos fixos de grupo e de animal dentro de grupo.

## 5. DISCUSSÃO

Sabe-se que as quimiocinas são reguladoras da resposta imune inata e adquirida contra microorganismos invasores, por meio do controle do tráfego de leucócitos nos tecidos (LUSSO, 2000). Os astrócitos e a microglia interagem de maneira equilibrada, para manter a homeostase do SNC. A ativação destas células frente a um agente agressor irá desencadear uma resposta imune, que poderá ser importante para a resolução ou para o agravamento do quadro neurológico. Isso ocorre devido a persistência do agente etiológico e a presença de produtos inflamatórios liberados no sítio da injúria. Os agentes virais são muito eficientes em adaptar-se às condições inóspitas criadas pelo sistema imune, como estratégia de sobrevivência. O VEV, utilizado no presente trabalho, é um importante modelo viral para o estudo da patogenia das encefalites em camundongos, por permitir a análise concomitante dos processos degenerativo e inflamatório do neurópilo, bem como o tipo de resposta glial frente a esse quadro infeccioso.

No presente estudo, verificou-se que a avaliação dos métodos de processamento dos cérebros incluídos em parafina, quanto ao tempo de permanência no formol e no álcool 70%, foi primordial para a qualidade do material analisado pela microscopia de luz. É importante salientar que um período prolongado no formol é indesejável para a preservação dos antígenos do tecido. Já a prolongada permanência no álcool, pode levar ao ressecamento do tecido e conseqüentemente a cortes quebradiços e de qualidade ruim para a leitura das lesões microscópicas, tanto em H&E quanto em imunoistoquímica. Constatou-se, neste estudo, que o ideal é que o material permaneça no máximo 8 a 12 horas no formol e por 12 a 24 horas no álcool, pois do contrário a qualidade da imunoistoquímica será prejudicada.

Os planos de corte testados nos cérebros fixados em formol foram o sagital e o transversal. Constatou-se que o plano transversal permitiu uma visualização maior de células dentro das diferentes áreas do cérebro. Isso pôde

ser observado na imunomarcção para GFAP, em que um número maior de células coradas foi visto no tálamo e hipotálamo, quando comparado com o plano sagital. Entretanto, foi difícil padronizar os cortes em todos os animais. O plano sagital, foi bastante interessante para avaliar a distribuição e extensão das lesões entre as áreas estudadas. Portanto, foi considerado de eleição para a padronização dos planos de corte de encéfalos processados em parafina. O plano de corte horizontal, adotado nos cérebros congelados, não permitiu avaliar as áreas do cérebro de forma uniforme. Seria interessante utilizar o plano sagital também para cérebros processados para congelação.

A sintomatologia clínica dos animais dos grupos G3, G6 e G7 iniciou-se no 5º. ou 6º. dias p.i., juntamente com a conjuntivite unilateral, indicando que o pico de infecção pelo VEV ocorreu nesta faixa de tempo. Dal Canto et al. (1979) observaram a presença do VEV no cérebro, por imunofluorescência, somente no 5º. dia p.i. e após este período não houve detecção de células positivas. Esse fato sugere que o pico de infecção ocorra nesta fase da encefalite experimental. Machado (1999) e Mazzucatto (2000) também observaram o início dos sinais clínicos neste período, em camundongos inoculados com VEV por via intranasal.

Os camundongos do grupo G6 iniciaram os sinais clínicos mais tardiamente (6º. dia p.i.) que os G7 (5º. dia p.i.), sugerindo que a depleção genética de IL-4 pode ter influenciado nesta diferença dentro da mesma linhagem (B6) de camundongos. No entanto, o período de 5 a 6 dias p.i. para o aparecimento dos sintomas neurológicos, nestes grupos, foi o mesmo observado em G3. As diferenças de idade entre os animais das linhagens Swiss (G1, G2 e G3), com aproximadamente 3 semanas de idade e da B6 (G6 e G7) com cerca de 56 semanas, não influenciaram no desenvolvimento da encefalite experimental. Sabin & Olitsky (1938) verificaram que camundongos adultos eram resistentes ao VEV, quando a via de inoculação foi a intranasal. Quando a inoculação ocorria via intracerebral, a susceptibilidade para o desenvolvimento da neuroinflamação era a mesma entre animais jovens e adultos (SABIN & OLITSKY, 1938, FEDERICI, 2000). No presente estudo, foi possível constatar

que a susceptibilidade à infecção cerebral pelo VEV pode ser dependente da linhagem de camundongos, quando a via de inoculação for intranasal. Machado (1999) optou em trabalhar com camundongos da linhagem C57BL/6, entre 25 e 30 dias, pois os mais jovens eram muito sensíveis ao VEV e os adultos não adoeciam. Falcone et al. (1998) verificaram que camundongos “knockout” para IL-4 tiveram sinais clínicos mais severos de EAE.

A evolução do quadro clínico para a paralisia de membros posteriores, possivelmente está associada com a replicação do VEV na região do tronco cerebral. Dal Canto et al. (1979) descreveram que a paralisia flácida observada neste quadro neurológico está relacionada com a presença do vírus em neurônios motores da medula espinhal, responsáveis pelo estímulo nervoso da musculatura pélvica e torácica.

Alguns dos animais desse estudo, que apresentavam ataxia de membros posteriores, mordiam-se nas patas e na cauda talvez por formigamento ou perda da sensibilidade dos membros durante a evolução do quadro clínico.

O desenvolvimento do quadro convulsivo provavelmente está associado com o agravamento das lesões degenerativas no SNC, ou seja, apenas os camundongos que tiveram maior tempo de infecção viral, desenvolveram lesões mais graves e tiveram maior perda neuronal. Esse quadro convulsivo não foi observado nos grupos G1 e G2. Embora em G2 dois animais tenham apresentado áreas de necrose significativas, não houve tempo para o desenvolvimento desta sintomatologia, já que os mesmos foram sacrificados no 4º. dia p.i. Huneycutt et al. (1993) propuseram que a causa da morte em camundongos infectados pelo VEV, poderia estar associada a lesões nos centros de controle nervoso, como o hipotálamo e o tronco cerebral, os quais estariam envolvidos com o apetite, a respiração e a regulação da temperatura. Nesse estudo, verificou-se que os animais apresentavam anorexia e alterações respiratórias que coincidiam com o pico da infecção. Na análise microscópica dos cérebros dos animais deste grupo verificou-se degeneração e necrose extensas nestas áreas, além do infiltrado inflamatório.

A necrose foi o aspecto mais relevante deste modelo de encefalite viral pelo VEV. Os neurônios foram as células mais afetadas pelo vírus e/ou mediadores químicos liberados durante a inflamação, uma vez que foi freqüente a observação de necrose neuronal. Huneycutt et al. (1993) verificaram que as mesmas células envolvidas na eliminação do vírus do SNC, podem causar lesões ao neurópilo. Linfócitos T  $CD4^{+}$  e  $CD8^{+}$  podem contribuir para o dano tecidual, pela síntese local de citocinas ( $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  e linfotóxina) em associação com o efeito citolítico da replicação viral ou pelo desenvolvimento de uma resposta imune inespecífica do hospedeiro. Os autores propuseram também que a interação do vírus com os neurônios e a glia é suficiente para promover essa cascata de citocinas ( $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , IL-1, IL-6).

No bulbo olfatório as lesões foram bastante discretas aos 2 dias p.i. (G1) e bastante severas aos 5 a 6 dias p.i. (G3, G6, G7). Constatou-se que a severidade e a extensão da necrose coincidiu com a evolução do tempo de infecção e com a presença de mais células marcadas pelo VEV pela imunistoquímica, em outras áreas do SNC. A observação de imunomarcagem para o VEV, de forma bastante discreta, no bulbo olfatório de todos os grupos experimentais infectados, indicou que o vírus chega ao SNC já ao 2<sup>o</sup>. dia p.i., como pôde ser visto pelos focos discretos de necrose nesta área em G1. Entretanto, sua replicação em neurônios do bulbo pareceu ser rápida, seguida da difusão do vírus para outras áreas do cérebro. A imunomarcagem do vírus em G1 foi mais discreta que G3, G6 e G7. Pode-se pressupor que em G1, poucas partículas virais migraram para o SNC e chegando ao bulbo, infectaram neurônios, causando os focos de necrose. Posteriormente, o vírus difundiu-se para outras áreas do encéfalo, como o infundíbulo hipofisário e o tronco cerebral, podendo ser detectado em alguns neurônios imunomarcados, associado a focos necróticos (G1 e G2). Machado (1999) e Mazzucatto (2000) também verificaram envolvimento inicial do bulbo olfatório, com evolução das lesões para o diencefalo e ponte na fase final da encefalite experimental pelo VEV.

Nos grupos G3, G6 e G7 as lesões necróticas foram mais extensas que em G1 e G2, porém a presença do vírus no bulbo foi rara, diferindo das demais áreas do cérebro (infundíbulo hipofisário, hipocampo e tronco cerebral). Nestes grupos a marcação de neurônios pelo anticorpo anti-VEV foi mais elevada do que nos grupos G1 e G2. O aumento da imunomarcação para o VEV, nestes grupos, possivelmente coincidiu com o pico da infecção (5 e 6 dias p.i.).

Plakhov et al. (1995) verificaram que o VEV, quando inoculado via intranasal, possui forte tropismo pelos receptores celulares olfatórios, que são sua porta de entrada no SNC. Huneycutt et al. (1993) e Plakhov et al. (1995) sugeriram que dentro do cérebro, o VEV é transmitido para outros neurônios, via sinapse (transaxonal) ou via ventricular (líquor e epêndima), antes que a expressão do antígeno viral ocorra de forma evidente no SNC.

Neste estudo, os camundongos da linhagem B6 tiveram lesões degenerativas no neurópilo mais graves que os G3. Os animais do grupo G6 (depletados para IL-4) tiveram lesões mais extensas que os do grupo G7 (B6 não depletados). Essas diferenças possivelmente relacionaram-se com as diferenças entre as linhagens de camundongos. Os camundongos Swiss (G3) possuem uma grande variabilidade genética e portanto podem apresentar respostas imunes diferentes. Já os camundongos da linhagem B6 são animais isogênicos, ou seja, possuem um MHC idêntico e com isso talvez essa linhagem seja menos eficiente em montar uma resposta imune e também mais susceptível a infecção pelo VEV.

Falcone et al. (1998) observaram que camundongos “knockout” para IL-4 tiveram lesões de EAE mais severos e mais extensos, com envolvimento do cérebro e da medula espinhal. Os autores sugerem que houve um aumento substancial na expressão de citocinas pró-inflamatórias nesses animais, causando o agravamento do quadro neurológico.

Neste estudo, o padrão de migração do VEV dentro do SNC foi pelo “assoalho” do cérebro, iniciando pelo bulbo olfatório e atingindo o tronco cerebral na fase final. Nas áreas de necrose do neurópilo, observou-se imunomarcação para o vírus em intensidades diferentes nas áreas e nos grupos

estudados, ou seja, o vírus sempre esteve associado a necrose do neurópilo, porém a intensidade da imunomarcacão variou com o tempo de infecção.

Huneycutt et al. (1993) observaram que o córtex cerebral e o cerebelo não foram afetados pelo VEV em camundongos infectados acima de 7 dias p.i. Os autores constataram também, que a disseminação viral é maior dentro de regiões do SNC que são distais ao nariz, quando a via de infecção é intranasal. O presente estudo coincide com as observações microscópicas desses autores.

Neste estudo, a reação inflamatória do SNC foi discreta a moderada, atingindo as meninges de forma focal, sempre nos locais onde havia necrose. Os manguitos perivasculares foram discretos e mais evidentes no infundíbulo hipofisário (tálamo e hipotálamo) e em menor proporção no tronco cerebral. O aspecto mais interessante foi o envolvimento do sistema ventricular. A presença de infiltrado subependimário foi constante em todos os grupos infectados pelo VEV. Os ventrículos laterais foram os mais afetados, seguidos pelo terceiro e quarto ventrículos. Interpretou-se que o vírus tem afinidade pelo sistema ventricular.

Huneycutt et al. (1993) também verificaram que a resposta inflamatória e a necrose ocorriam ao longo do sistema ventricular, salientando que a distribuição das lesões coincidia com a detecção viral por imunoistoquímica. Federici (2000) observou ao nível ultraestrutural, o envolvimento de neurônios e células endependimárias na infecção pelo VEV, além de partículas virais livres no espaço subependimário.

Dorf et al. (2000) propuseram que algumas quimiocinas da família  $\alpha$ , têm a habilidade de atrair leucócitos para o espaço perivascular. Com isso, causam a perda da interação entre os processos citoplasmáticos de astrócitos e o endotélio e prejudicam a integridade da BHE. Isso favoreceria a infiltração leucocitária do neurópilo e a liberação de substâncias neurotóxicas. Merrill & Benveniste (1996) descrevem que o efeito quimioatraente para a chegada de linfócitos ao SNC, deve-se à liberação de citocinas e à expressão de moléculas de adesão, pelos leucócitos, endotélio e células gliais, o que leva ao recrutamento adicional de mais leucócitos. Gangur et al. (2002) sugerem que as

quimiocinas e as moléculas de adesão facilitam o tráfego de leucócitos no SNC. As citocinas ativam as selectinas endoteliais e as quimiocinas estimulam as integrinas leucocitárias, favorecendo a migração celular pelo endotélio.

Kettenmann & Ranson (1995) afirmaram que  $\text{TNF-}\alpha$  é um potente estimulador de astrócitos na produção de citocinas, que podem aumentar a resposta inflamatória, pela atração de granulócitos e macrófagos para o sítio de neuroinflamação. Machado (1999) e Liu & Lane (2001) verificaram que a inibição de  $\text{IFN-}\gamma$ , nos modelos virais com VEV e com o vírus da hepatite do camundongo respectivamente, causou aumento da severidade da doença no SNC e uma diminuição do controle da replicação viral. Essa citocina é importante na eliminação do vírus do SNC.

O tipo de infiltrado observado na meningite, na ventriculite e nos manguitos foi misto, caracterizado por neutrófilos e em menor proporção por linfócitos e alguns macrófagos. Os debris celulares perivasculares do infundíbulo hipofisário foram um aspecto interessante nos animais da linhagem B6 (G6 e G7) e em menor proporção de G3. Esse aspecto é característico de apoptose e pode estar associado a fatores liberados neste local por células residentes ou leucócitos infiltrantes no SNC ou ainda induzidos pelo VEV. A presença do VEV foi marcante na periferia destes locais nos grupos infectados (G3, G6 e G7). Kettenmann & Ranson (1995) verificaram que os astrócitos ativados podem causar apoptose em linfócitos T ativados, que interagem com antígenos apresentados no local da injúria.

No presente estudo, os camundongos da linhagem B6, dos grupos G6 e G7 respectivamente, apresentaram uma reação inflamatória um pouco mais evidente que os Swiss (G3). Esse aspecto foi observado em camundongos “knockout” para IL-4 com EAE (FALCONE et al., 1998). Os camundongos que desenvolveram encefalite experimental pelo vírus Sindbis, apresentaram produção das citocinas IL-4 e IL-10 pelas células residentes do SNC, salientando a importância dessas citocinas regulatórias nos quadros de encefalite a vírus (WESSENLINGH et al., 1994).

A vacuolização do citoplasma endotelial do plexo coróide foi um aspecto evidente em todos os grupos infectados. Essa alteração morfológica pode ser sugestiva de um estado de ativação destas células frente ao quadro de encefalite viral. Miyoshi & Harter (1971) descrevem o relato de Bruno-Lobo (1968), que identificou o antígeno viral em células endoteliais e do epêndima, aos 2 dias p.i., em camundongos adultos inoculados via intraperitoneal com VEV. Grodums (1976) observou o VEV infectando células ependimárias e subependimárias, porém sem envolvimento do plexo coróide. As alterações morfológicas observadas no plexo coróide seriam pelo dano viral ao tecido periventricular ou pela presença do vírus nos ventrículos cerebrais. Federici (2000) também verificou a infecção do epêndima e região subependimária pelo VEV, sem envolvimento do endotélio do plexo coróide.

Miyoshi & Harter (1971) afirmaram que o VEV não tem predileção pelas células de Purkinje, como é visto na raiva murina experimental. Nesse estudo, verificou-se imunomarcagem para o VEV em algumas células de Purkinje cerebelares de um animal do grupo 7.

A gliose focal observada nos grupos inoculados com o VEV apareceu sempre no córtex cerebral, algumas vezes associada a necrose neuronal. O fato mais relevante foi quando essas células foram imunomarcadas com anticorpo anti-GFAP. A reação positiva ao anticorpo foi bastante discreta. Supõe-se que a maioria da população celular que compõe a gliose é microglial ou que os astrócitos existentes estejam expressando outro tipo de filamento intermediário, como a vimentina. Kettenmann & Ranson (1995) observaram que muitos dos astrócitos do cérebro adulto, principalmente da substância cinzenta, são negativos para o filamento intermediário GFAP, pela coloração de imunoistoquímica. A vimentina, no entanto, pode ser expressa por astrócitos em estado proliferativo ou menos diferenciado.

Os astrócitos apresentaram lesões interessantes com a evolução do quadro neurológico. Nos animais controle (G4 e G5) e em G1 a morfologia astrocitária foi caracterizada pelos longos prolongamentos citoplasmáticos e pelo número de células marcadas, que foi mais evidente no bulbo olfatório, no

corpo caloso e no hipocampo. Em menor proporção estão o infundíbulo hipofisário e o tronco cerebral. Nos locais onde havia necrose, sempre houve redução e/ou fragmentação de processos citoplasmáticos de astrócitos. O número de células nestes locais foi menor. Já na periferia da necrose a astrocitose reativa foi evidente. Essa observação é indicativa de que os astrócitos são sensíveis tanto quanto os neurônios a fatores citotóxicos liberados durante o desenvolvimento da necrose, talvez induzidos pelo VEV e/ou por células inflamatórias e/ou pela microglia ativada nestas áreas. Mazzucatto (2000) verificou a presença de astrocitose reativa na periferia das lesões necróticas do neurópilo de camundongos infectados pelo VEV. Machado (1999) verificou que a reatividade astrocitária foi mais evidente no dia 4 p.i. A partir do dia 6 p.i., as características degenerativas destas células aumentavam no centros necróticos e a astrocitose reativa era marcante na periferia das lesões. Federici (2000) encontrou grande reatividade astrocitária na periferia ventricular, possivelmente pela ação citopática do VEV neste local. Jardim (2003) observou que houve hipertrofia do núcleo astrocitário em camundongos Swiss inoculados com o VEV, quando comparados com os do grupo controle, indicando astrocitose reativa em resposta a injúria viral ao SNC.

Estudou-se a variação na densidade e no diâmetro dos astrócitos nos camundongos da linhagem Swiss, infectados ou não pelo VEV. A densidade e o diâmetro do núcleo dos astrócitos apresentaram uma variação não significativa entre os grupos (G3 a G5), mas a variação individual de animal dentro de grupo foi significativa e influenciou a medida do núcleo e o número de astrócitos. Essas características apresentaram variações significativas nas diferentes áreas, ou seja, a resposta foi diferente em cada área, nos diferentes grupos testados. Como não houve diferenças significativas entre os grupos, sugere-se que isso deve-se à extensa necrose do cérebro observada em G3. Nas áreas de necrose o número de astrócitos positivos para GFAP foi menor. Os que restaram apresentavam lesões evidentes em seus processos citoplasmáticos e redução do volume nuclear. A influência de animal dentro de grupo, possivelmente deve-se à variação na intensidade das lesões vistas em cada

animal do grupo, nas diferentes áreas. A variação do tamanho do núcleo e do número de astrócitos dentro das áreas, nos diferentes grupos, também pode estar associada a presença ou a ausência de necrose e à intensidade destas lesões. Kettenmann & Ranson (1995) observaram que há uma variação no número e volume nuclear dos astrócitos, nas diferentes regiões anatômicas do cérebro. O hipocampo é a área que apresenta os astrócitos com maior núcleo e com prolongamentos mais evidentes.

A redução da densidade dos astrócitos coincidiu com o evidente aumento do número de células microgliais no pico da infecção. Por este fato, é possível sugerir que os astrócitos são uma das células que controla a proliferação microglial. Uma vez lesados, os astrócitos podem perder o controle sobre a microglia ou então liberar produtos inflamatórios que estimulem a multiplicação microglial, para participar da resposta imune nesta fase da encefalite.

A astrocitose reativa é um aspecto típico dos astrócitos que estão no sítio de injúria (CUNHA et al., 1993, ENG & GHIRNIKAR, 1994, KETTENMANN & RANSON, 1995, MACHADO & ALESSI, 1997, LEMOS & ALESSI, 1999, ALESSI et al., 2000, SLOANE et al., 2000, JARDIM et al., 2001, MAZZUCATTO & ALESSI, 2001). O aumento da expressão de GFAP é proporcional com o aumento da idade em ratos, camundongos e homem (ENG & GHIRNIKAR, 1994). Nos macacos Rhesus velhos observou-se um aumento da expressão de GFAP e hipertrofia astrocitária, porém a densidade celular manteve-se inalterada (SLOANE et al., 2000). Segundo Kettenman & Ranson (1995), a citocina IL-1 pode contribuir para a astrogliose e estimular a produção de outras citocinas por estas células.

No cérebro normal, a densidade de astrócitos pode variar também com a região anatômica. Nos processos patológicos que cursam com gliose, os astrócitos aumentam em número, tamanho e expressão de GFAP. Muitas vezes não se observa correlação alta entre gliose e densidade astrocítica, sugerindo que muitas vezes o astrócito aumenta em tamanho, mas não em número ou intensidade de coloração para GFAP (CUNHA et al., 1993).

Nesse estudo, constatou-se que células microgliais positivas para o anticorpo antimicroglia, foram vistas associadas ao infiltrado perivascular e a focos necróticos da região talâmica. As células microgliais apareceram em pequeno número no cérebro de animais controle ou no início da infecção (G1). Este número aumentou intensamente com a evolução e a gravidade das lesões (G3, G6, G7). O aumento significativo da microglia nos grupos infectados parece estar associado com a gravidade das lesões do neurópilo nesta fase da infecção. A microglia é ativada e prolifera à medida que as lesões aumentam e que a quantidade de partículas virais também aumenta. Espera-se portanto, que seja uma resposta da microglia à ativação induzida por astrócitos ativados e/ou por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias liberadas durante a neuroinfecção. Essa ativação talvez tenha como principal função a atividade fagocítica desta célula frente à extensa necrose do SNC e à inclusão da microglia na resposta imune, já que os astrócitos foram bastante lesados nesta fase da encefalite experimental. O aumento da densidade microglial, com a evolução do quadro neurológico do VEV, foi inversamente proporcional à densidade astrocitária. Perry et al. (1993) e Kettenman & Ranson (1995) constataram que a microgliose reativa pode ser estimulada por processos degenerativos que cursam com morte celular (neurônios) e com a produção de citocinas ou de quimiocinas, entre outros. Kettenman & Ranson (1995) também relataram que a secreção de IL-6 pode estimular astrócitos a liberar CsFs e com isso estimular a proliferação microglial e a fagocitose.

A diversidade morfológica da microglia quando ativada ou em repouso, sugere que estas transformações microgliais são acompanhadas por mudanças no fenótipo celular e na produção e secreção de citocinas (KETTENMANN & RANSON, 1995, LOKENSGARD et al., 2000). Neste modelo viral, foi possível observar a morfologia microglial variando de ramificada a arredondada, de acordo com seu estado de ativação. Rezaie et al. (2002) constataram que os astrócitos direcionam a transformação morfológica e a motilidade da microglia, *in vitro*, pela expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$  e MCP-1.

Kettenmann & Ranson (1995) afirmaram que a microglia pode levar a danos neurotóxicos, devido a liberação de neurotoxinas. A interação entre a microglia e os astrócitos (*in vitro*) pode regular a sobrevivência neuronal. Ou seja, a competição entre estas células gliais, por mecanismos secretórios opostos, deve influenciar *in vivo* na viabilidade tecidual. Produtos liberados por células inflamatórias também podem contribuir para a neurotoxicidade. Streit & Kincaid-Colton (1995) descreveram que o SNC, aparentemente, mantém a microglia sob rígido controle, forçando-a a secretar quantidades mínimas de produtos que poderiam ser neurotóxicos. Nesse estudo observou-se uma concentração maior desta célula nos animais com maior tempo de infecção e conseqüentemente com necrose mais grave, sugerindo que além do efeito nocivo do VEV, talvez a microglia possa estar liberando produtos inflamatórios de forma exacerbada, tais como óxido nítrico e formas livres de oxigênio, causando lesão neuronal grave. Esse fato foi citado por Bajetto et al. (2001) em neuropatias traumáticas.

Koszinowski et al. (1991) afirmaram que a liberação local de citocinas, por linfócitos T, pode contribuir para a eliminação seletiva de agentes virais por meio de um efeito antiviral direto (citólise), via linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e, por uma combinação de efeitos indiretos relacionados a células efetoras específicas ou inespecíficas da resposta imune. A liberação local de IFN- $\gamma$ , que tem potente efeito sobre a regulação da expressão de genes do MHC classe II, aumenta a apresentação de antígenos e induz a um estado antiviral em células adjacentes ao sítio de injúria. Huneycutt et al. (1993) observaram que os linfócitos T são essenciais em limitar a replicação e a disseminação do VEV para o cérebro e em promover a recuperação do quadro neurológico.

Kettenman & Ranson (1995) constataram que a interação entre os astrócitos e os linfócitos é bidirecional, isto é, os astrócitos apresentam antígenos para linfócitos e estes liberam citocinas solúveis que induzem a expressão de moléculas do MHC e de adesão e a proliferação glial. Por este fato, sugere-se que neste modelo de encefalite pelo VEV, exista a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), que possuem efeitos antivirais e podem ativar células gliais residentes a produzir citocinas e quimiocinas, capazes de exercer

efeitos quimiotáticos sobre as populações de leucócitos, que irão migrar até o SNC, em resposta a encefalite viral. Machado (1999) observou que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são citocinas importantes na eliminação do vírus do SNC, porém podem apresentar efeitos deletérios ao neurópilo, agravando o quadro neurodegenerativo induzido pelo VEV.

Nesta pesquisa, a quimiocina MIP-1 $\alpha$  foi positiva em todos os grupos testados, com menor intensidade imunoistoquímica nos camundongos dos grupos 6 e 7. Células com morfologia diferente expressaram esta quimiocina nos grupos controle e infectados. Tipos celulares com morfologia de neurônios, astrócitos e microglia apresentaram imunomarcacão para MIP-1 $\alpha$ . A menor intensidade de imunomarcacão para MIP-1 $\alpha$  nos grupos G6 e G7 (B6) pode estar associada ao fato de ser uma linhagem isogênica de camundongos, quando comparada com G3 (Swiss). Entretanto deve-se destacar também que os animais do grupo G6 eram depletados geneticamente para IL-4 e tiveram lesões mais graves que G7 e G3 respectivamente. Outro fato seria que a ausência de IL-4 pode estar influenciando no tipo de resposta imune destes animais. Sabe-se que IL-4 e IL-10 atuam simultaneamente no controle dos efeitos nocivos das citocinas pró-inflamatórias. Talvez, nos animais do grupo G6, esteja ocorrendo predomínio de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que poderiam estar contribuindo para o agravamento das lesões cerebrais, juntamente com a microglia e o VEV.

Nagai et al. (2001) afirmaram que a microglia estimulada, *in vitro*, pode expressar as quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 e IL-8. A expressão de MIP-1 $\alpha$  em neurônios foi descrita por Lavi et al. (1998) e por Bajetto et al. (2001). Segundo estes últimos autores, esta quimiocina também pode influenciar a atividade migratória de astrócitos, mesmo em concentrações mínimas.

Jardim (2003) verificou, por meio da técnica de RT-PCR, que MIP-1 $\alpha$  tem uma expressão constitutiva no SNC de camundongos saudáveis. Essa expressão aumenta significativamente nos animais que receberam o VEV, via intranasal e estão no pico da infecção. A quimiocina MIP-1 $\beta$  foi pró-inflamatória, pois sua expressão ocorreu somente no pico da infecção.

Neste estudo foram observadas intensidades diferentes de imunomarcação para essa quimiocina em neurônios. A marcação foi mais forte em células mais preservadas e mais fraca em células com aspecto degenerado. Acredita-se que talvez a expressão de MIP-1 $\alpha$  nestas células lesadas seja menor, provavelmente pelo processo de morte neuronal em andamento. Outra possibilidade seria que esses neurônios estivessem infectados pelo VEV e estivessem expressando uma forma viral de MIP-1 $\alpha$ . O mesmo tipo de imunomarcação foi vista em neurônios do tronco cerebral, dos grupos infectados, quando utilizou-se o anticorpo anti-VEV, caracterizando a presença do vírus nestas células degeneradas. Lusso (2000) e Dairaghi et al. (1997) descreveram mecanismos de evasão imune de alguns vírus, onde a produção de quimiocinas e seus receptores é codificada por esses agentes, facilitando a sobrevivência e a difusão destes no tecido infectado. Martínéz & Pando (1999) afirmaram que MIP-1 $\alpha$  é muito importante no processo inflamatório causado por alguns vírus, por exercer ação quimioatraente sobre os linfócitos e os monócitos.

Nessa pesquisa, a densidade de células positivas para MIP-1 $\alpha$ , no tronco cerebral dos camundongos dos grupos controle (G4 e G5) ou infectados (G3), apresentou a maior média para o grupo G3. Entretanto, este grupo não diferiu estatisticamente do grupo G4, mas ambos diferiram de G5. A densidade de células que expressou essa quimiocina foi muito próxima entre G3 e G4, possivelmente a necrose observada no tronco cerebral dos animais G3 levou a redução das células que expressam MIP-1 $\alpha$  nessa região do cérebro.

Lusso (2000) descreve que muitos tipos celulares produzem quimiocinas pró-inflamatórias, mas o sinal inicial para esta produção seria emitido por células residentes do tecido injuriado, com amplificação da resposta por células apresentadoras de antígeno e linfócitos T. Bajetto et al. (2001) afirmaram que muitas vezes a expressão de quimiocinas, seguida da chegada de leucócitos dentro do SNC, teria a função de amplificar em vez de iniciar a resposta inflamatória nesse órgão.

A expressão de MIP-1 $\beta$  foi mais significativa nos grupos infectados, especialmente nos camundongos de G6 e G7. A morfologia das células que expressaram esta quimiocina é muito semelhante a da microglia, tanto nas áreas necróticas quanto nos discretos focos com a forma ramificada. Esse aspecto é sugestivo de que a microglia fagocítica expressaria MIP-1 $\beta$ , durante a fagocitose, para atrair mais leucócitos ao sítio da infecção. A forma ramificada e com núcleo alongado, vista em áreas distantes da lesão viral, poderia sugerir a expressão desta quimiocina por células microgliais não ativadas. Jardim (2003) não observou a expressão constitutiva de MIP-1 $\beta$  nos grupos de camundongos não infectados, mas a verificou nos grupos com 4 dias p.i. (G2) e 5 a 6 dias p.i. (G3), por meio da técnica de RT-PCR.

Bajetto et al. (2001) descreveram que MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e MCP-1 foram expressas, em níveis mínimos, em cultura microglial não estimulada. A produção de MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  aumentou em resposta ao estímulo por LPS, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ .

McManus et al. (1998) verificaram que as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), produzidas por linfócitos Th1, podem induzir a expressão de MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  na microglia (*in vitro*). O mesmo fato foi observado por Nagai et al. (2001) em cultura microglial de cérebros de embrião humano.

Liu & Lane (2001) observaram que no modelo de encefalite pelo vírus da hepatite do camundongo (MHV), houve expressão, em astrócitos e microglia, de  $\alpha$ -quimiocinas (IP-10) nas áreas de replicação do vírus, nos estágios precoces da encefalite (dia um p.i.). No sexto dia p.i. ocorreu a difusão viral no cérebro e houve um aumento na expressão de quimiocinas por estas células, com detecção de  $\alpha$  (IP-10, MIG) e  $\beta$ -quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  e Rantes).

Neste estudo, possivelmente também ocorreu um predomínio de  $\alpha$ -quimiocinas na fase inicial da encefalite (2 $^{\circ}$  e 4 $^{\circ}$  dias p.i.), pois houve predomínio de neutrófilos no infiltrado inflamatório das meninges e das regiões perivascular e subependimária. No grupo G3 (5 a 6 dias p.i.), apesar do predomínio de neutrófilos, já aparecem linfócitos no infiltrado inflamatório. Possivelmente se houvesse evolução da encefalite (acima de 10 dias p.i.), o perfil de quimiocinas

seria predominantemente da família das  $\beta$ -quimiocinas, pois já iria ocorrer um número maior de linfócitos no infiltrado inflamatório do cérebro.

Em síntese, poderia se propor que neste modelo de encefalite experimental induzida pelo VEV, existe uma grande rede de comunicação química entre as células nervosas. Possivelmente, os neurônios quando infectados pelo VEV, produzem citocinas e quimiocinas capazes de ativar os astrócitos e também o endotélio vascular. Essa ativação resultaria na produção de mais citocinas, quimiocinas e fatores de crescimentos (CsFs), que favoreceriam a migração leucocitária do lúmen vascular até o neurópilo e meninges. A microglia, por sua vez, é ativada por astrócitos na fase inicial da infecção e tem seu pico de ativação com a progressão das lesões degenerativas do cérebro.

A reação inflamatória mista, com predominância de neutrófilos, apesar de ter discreta intensidade, deve ter sido estimulada também por  $\alpha$ -quimiocinas (IL-8, GRO- $\alpha$ , dentre outras). Pesquisas futuras são necessárias para elucidar a importância de cada tipo de quimiocina, na evolução da encefalite. Isso poderia ser feito pela quantificação das mesmas em cada fase da infecção viral. A determinação de um perfil das principais quimiocinas que participam da patogenia destas lesões do SNC é essencial para a compreensão destes eventos imunológicos complexos que ocorrem em resposta a um agente infeccioso.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

- A microgliose reativa tornou-se evidente no pico da infecção pelo VEV (5<sup>o</sup>. ou 6<sup>o</sup>. dias p.i.), nas três linhagens de camundongos, possivelmente pelo estímulo dos neurônios necróticos ou de fatores quimiotáticos e proliferativos liberados no sítio da injúria;
- A morfologia da microglia variou de acordo com seu estado de ativação, indicando a atividade imune e fagocitária desta célula de acordo com o estímulo;
- Os astrócitos e os neurônios foram as células mais sensíveis aos fatores citotóxicos liberados durante a neuroinfecção. O VEV e a microglia sempre estiveram associados aos focos de necrose destas células;
- A densidade astrocitária foi inversamente proporcional à densidade microglial no pico da infecção;
- Apesar da presença de MIP-1 $\alpha$  nos camundongos dos grupos controle e infectados, parece que essa quimiocina ainda não é primordial nesta fase da neuroinfecção pelo VEV.
- A expressão de MIP-1 $\beta$  esteve relacionada às células do infiltrado inflamatório e a células presentes na periferia das áreas de necrose, predominantemente no pico da infecção, sugerindo seu caráter pró-inflamatório.
- Os camundongos da linhagem B6 (C57BL/6 IL-4<sup>-/-</sup> e C57BL/6) foram mais susceptíveis a infecção experimental pelo VEV, quando comparados com a linhagem Swiss (G3).

## 7. REFERÊNCIAS

ALESSI, A.C.; FEDERICI, T.H.G.; MAZZUCATTO, B.C.; MACHADO, G.F. Astrocytic reaction in experimental vesicular stomatitis virus encephalitis in mice. **Brain Pathol.**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 753-754, 2000.

ANDJELKOVIC, A.V.; SPENCER, D.D.; PACHTER, J.S. Visualization of chemokine binding sites on human brain microvessels. **J. Cell Biol.**, Nova Iorque, v. 145, n. 2, p. 403-412, 1999.

BAJETTO, A.; BONAVIA, R.; BARBERO, S.; FLORIO, T.; SCHETTINI, G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. **Front. Neuroendocrinol.**, Nova Iorque, v. 22, p. 147-184, 2001.

BETTELLI, E.; DAS, M.P.; HOWARD, E.D.; WEINER, H.L.; SOBEL, R.A.; KUCHROO, V.K. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10 and IL-4-deficient and transgenic mice. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 161, p. 3299-3306, 1998.

BI, Z.; QUANDT, P.; KOMATSU, T.; BARNA, M.; REISS, C.S. IL-12 promotes enhanced recovery from vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 155, n. 12, p. 5684-5689, 1995.

BOVEN, L.A.; MONTAGNE, L.; NOTTET, H.S.; DE GROOT, C.J. Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 122, n. 2, p. 257-263, 2000.

BUSSEREAU, F.; FLAMAND, A.; PESE-PART, D. Reproducible plaquing system for rabies in cerebellar cells. **J. Virol. Meth.**, Amsterdam, v. 4, p. 277-282, 1982.

CARDOSO, T.C.; RAHAL, P.; PILZ, D.; TEIXEIRA, M.C.B.; ARNS, C.W. Replication of classical bursal disease virus in chicken embryo related cell line. **Avian Pathol.**, Houghton, v. 29, p. 213-217, 2000.

CHABOT, S.; WILLIAMS, G.; HAMILTON, M.; SUTHERLAND, G.; YONG, V.W. Mechanisms of IL-10 production in human microglia - T cell interaction. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, n. 11, p. 6819-6828, 1999.

CUNHA, A.; JEFFERSON, J.J.; TYOR, W.R.; GLASS, J.D.; JANNOTTA, F.S.; VITKOVIC, L. Gliosis in human brain: relationship to size but not other properties of astrocytes. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 600, p. 161-165, 1993.

DAIRAGHI, D.J.; GREAVES, D.R.; SCHAN, T.J. Abdiction of chemokine elements by herpesviruses. **Semin. Virol.**, Londres, v. 8, n. 5, p. 377-385, 1998. Disponível em: <[www.idealibrary.com/links/doi/10.1006/smvy.1997.0146](http://www.idealibrary.com/links/doi/10.1006/smvy.1997.0146)> Acesso em: 23 set. 2002.

DAL CANTO, M.C.; RABINOWITZ, S.G.; JOHNSON, T.C. Subacute infection with temperature-sensitive vesicular stomatitis virus mutant G41 in the central nervous system of mice. II. immunofluorescent, morphologic, and immunologic studies. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 139, n. 1, p. 36-51, 1979.

DORF, M.A.; BERMAN, M.A.; TANABE, S.; HEESSEN, M.; LUO, Y. Astrocytes express functional chemokine receptors. **J. Neuroimmunol.**, Amsterdam, v. 111, p. 109-121, 2000.

EHRlich, L.C.; HU, S.; SHENG, W.S.; SUTTON, R.L.; ROCKSWOLD, G.L.; PETERSON, P.K.; CHAO, C.C. Cytokine regulation of human microglial cell IL-8 production. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 160, p. 1944-1948, 1998.

ENG, L.F.; GHIRNIKAR, R.S. GFAP and astrogliosis. **Brain Pathol.**, Cambridge, v. 4, p. 229-237, 1994.

FALCONE, M.; RAJAN, A.J.; BLOOM, B.R.; BROSANAN, C.F. A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 Mice and Balb/c mice. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 160, p. 4822-4830, 1998.

FEDERICI, T.H.G. **Estudo sobre as alterações estruturais e ultra-estruturais causadas pelo vírus da estomatite vesicular no SNC de camundongos. I – Infecção experimental por via intracerebral.** 2000. 92 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

FRABRY, Z.; RAINE, C.S.; HART, M.N. Nervous tissue as an immune compartment the dialect of the immune response in the CNS. **Immunol. Today**, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 218-224, 1994.

FREI, K.; MALIPIERO, U.V., LEIST, T.P.; ZINKERNAGEL, R.M.; SCHWAB, M.E.; FONTANA, A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 19, p. 689-694, 1989.

FORGER, J.M.; BRONSON, R.T.; HUANG, A.S.; REISS, C.S. Murine infection by vesicular stomatitis virus: initial characterization of the H-2<sup>d</sup> system. **J. Virol.**, Washington, v. 65, p. 4950-4958, 1991.

GANGUR, V.; BIRMINGHAM, N.P.; THANESVORAKUL, S. Chemokines in health and disease. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 86, p. 127-136, 2002.

GLABINSKI, A.R.; TANI, M.; ARAS, S.; STOLER, M.H.; TUOHY, V.K.; RANSOHOFF, R.M. Regulation and function of central nervous system chemokines. **Int. J. Dev. Neurosci.**, Oxford, v. 13, n. 3/4, p. 153-165, 1995.

GRODUMS, E.I. Ultrastructure of mouse periventricular and choroid plexus tissues in experimental vesicular stomatitis virus infection. **Arch. Virol.**, Viena, v. 51, n. 1-2, p. 75-85, 1976.

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

HUNEYCUTT, B.S.; BI, Z.; AOKI, C.J.; REISS, C.S. Central neuropathogenesis of vesicular stomatitis virus infection of immunodeficient mice. **J. Virol.**, Washington, v. 67, n. 11, p. 6698-6706, 1993.

JARDIM, L.S.; ANDRADE-NETO, J. P.; ALESSI, A.C. Astrocytic reaction in the canine granulomatous meningoencephalomyelitis. **Arquiv. Bras. Med. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 2, p. 188-190, 2001.

JARDIM, L.S. **Quimiocinas MIP-1alfa, MIP-1beta e Rantes na encefalite experimental induzida pelo vírus da estomatite vesicular em camundongos.** 2003. 80 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

KETTENMANN, H.; RANSON, B.R. **Neuroglia.** New York : Oxford, 1995. 1079 p.

KITAI, R.; ZHAO, M.L.; ZHANG, N.; HUA, L.L.; LEE, S.C. Role of MIP-1 $\beta$  and Rantes in HIV-1 infection of microglia: inhibition of infection and induction by IFN- $\beta$ . **J. Neuroimmunol.**, Amsterdam, v. 110, p. 230-239, 2000.

KOSZINOWSKI, U.H.; REDDEHASE, M.J.; JONJIC, S. The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v. 3, p. 471-475, 1991.

LAVI, E.; KOLSON, D.L.; ULRICH, A.M.; FU, L.; GONZÁLEZ-SCARANO, F. Chemokine receptors in the human brain and their relationship to HIV infection. **J. Neurovirol.**, Philadelphia, v. 4, p. 301-311, 1998.

LEMOIS, K.R.; ALESSI, A.C. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida em equinos normais ou com leucoencefalomalacia. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 104-108, 1999.

LITTMAN, D.R. Chemokine receptors: keys to aids pathogenesis? **Cell**, Cambridge, v. 93, p. 677-680, 1998.

LIU, M.T.; LANE, T.E. Chemokine expression and viral infection of the central nervous system: regulation of host defense and neuropathology. **Immunologic Res.**, Basel, v. 24, n. 2, p. 111-119, 2001.

LODGE, P.A.; SRIRAM, S. Regulation of microglial activation by TGF- $\beta$ , IL-10 and CSF-1. **J. Leukocyte Biol.**, Nova Iorque, v. 60, n. 4, p. 502-508, 1996.

LUSSO, P. Chemokines and viruses: the dearest enemies. **Virol.**, Duluth, v. 273, n. 2, p. 228-240, 2000.

MACHADO, G.F. **Papel do IFN-gama e do TNF-alfa na imunopatologia da encefalite experimental induzida pelo vírus da estomatite vesicular em**

**camundongos C57BL/6.** 1999. 129 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

MACHADO, G.F.; ALESSI, A.C. Glial fibrillary acidic protein (Gfap) immunoreactive astrocytes in the CNS of normal and rabies-infected adult cattle. I. Hippocampus and dentate gyrus. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 332-335, 1997.

MACIEJEWSKI-LENOIR, D.; CHEN, S.; FENG, L.; MAKI, R.; BACON, K.B. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> - expressing microglia. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 163, p. 1628-1635, 1999.

McMANUS, C.M.; BROSNAN, C.F.; BERMAN, J.W. Cytokine induction of MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  in human fetal microglia. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 160, p. 1449-1455, 1998.

MARTINEZ, C.M.M.; PANDO, R.H. Las quimiocinas, una nueva familia de citocinas en el reclutamiento de células inflamatorias. **Rev. Invest. Clin.**, v. 51, n. 4, p. 255-268, 1999.

MERRILL, J.E.; BENVENISTE, E.N. Citokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. **Trends Neurosci.**, Cambridge, v. 19, n. 8, p. 331-338, 1996.

MAZZUCATTO, B.C.; ALESSI, A.C. Alterações estruturais e ultra-estruturais causadas pelo VEV no SNC de camundongos. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 10., 2001, Pirassununga SP. **Resumos...** Jaboticabal: Funep, 2001. p. 93.

MAZZUCATTO, B.C. **Estudo sobre as alterações estruturais e ultra-estruturais causadas pelo vírus da estomatite vesicular no SNC de camundongos. Infecção experimental por instilação intranasal.** 2000. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

MIYOSHI, K.; HARTE, D.H. Neuropathological and immunofluorescence studies of experimental vesicular stomatitis virus encephalitis in mice. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Pittsburgh, v. 30, p. 266-277, 1971.

NAGAI, A.; NAKAGAWA, E.; HATORI, K.; CHOI, H.B.; MCLARNON, J.G.; LEE, M.A.; KIM, S.U. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. **Neurobiol. Dis.**, San Diego, v. 8, n. 6, p. 1057-1068, 2001.

Disponível em: <[www.idealibrary.com/links/doi/10.1006/nbdi.2001.0437](http://www.idealibrary.com/links/doi/10.1006/nbdi.2001.0437)> Acesso em: 23 set. 2002.

PERRY, V.H.; ANDERSSON, P.B.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. **TINS**, Cambridge, v. 16, n. 7, 1993.

PERSIDSKY, Y.; GHORPADE, A.; RASMUSSEN, J.; LIMOGES, J.; LIU, X.J.; STINS, M.; FIALA, M.; WAY, D.; KIM, K.S.; WITTE, M.H.; WEINAND, M.; CARHART, L.; GENDELMAN, H.E. Microglial and astrocyte chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. **Am. J. Pathol.**, Hagerstown, v. 155, n. 5, p. 1599-1611, 1999.

PLAKHOV, I.V.; ARLUND, E.E.; AOKI, C.; REISS, C.S. The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. **Virol.**, Duluth, v. 209, n. 1, p. 257-262, 1995.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.27, p. 493-497, 1938.

REZAIE, P.; TRILLO-PAZOS, G.; GREENWOOD, J.; EVERALL, I.P. Motility and ramification of human fetal microglia in culture: a investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. **Exp. Cell Res.**, Duluth, v. 274, n. 1, p. 68-82, 2002. Disponível em: <[www.idealibrary.com/links/doi/10.1006/excr.2001.5431](http://www.idealibrary.com/links/doi/10.1006/excr.2001.5431)> Acesso em: 23 set. 2002.

SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K. Influence of host factors on neuroinvasiveness of vesicular stomatitis virus. III. Effect of age and pathway of infection on the character and localization of lesions in the central nervous system. **J. Exp. Med.**, Nova Iorque, v. 67, p. 201-227, 1938.

SLOANE, J.A.; HOLLANDER, W.; ROSENE, D.L.; MOSS, M.B.; KEMPER, T.; ABRAHAM, C.R. Astrocytic hypertrophy white matter of the rhesus monkey. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 862, p. 1-10, 2000.

SORENSEN, T.L.; TANI, M.; JENSEN, J.; PIERCE, V.; LUCCHINETTI, C.; FOLCIK, V.A.; QIN, S.; ROTTMAN, J.; SELLEBJERG, F.; STRIETER, R.M.; FREDERIKSEN, J.L.; RANSOHOFF, R.M. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. **J. Clin. Invest.**, Nova Iorque, v. 103, n. 6, p. 807-815, 1999.

STOHLMAN, S.A.; PEI, L.; CUA, D.J.; LI, Z.; HINTON, D.R. Activation of regulatory cells suppresses experimental allergic encephalomyelitis via secretion of IL-10. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 163, p. 6338-6344, 1999.

STREIT, W.J.; KINCAID-COLTON, C.A. The brain's immune system. **Sci. Am.**, Nova Iorque, p. 38-43, 1995.

TIZARD, I.R. Citocinas e sistema imune. In: TIZARD, I.R. Imunologia veterinária: uma introdução. 5. ed. São Paulo: Rocca, 1998. p. 147-159.

THOMSEN, A.R.; NANSEN, A.; ANDERSEN, C.; JOHANSEN, J.; MARKER, O.; CHRISTENSEN, J.P. Cooperation of B cells and T cells is required for survival of mice infected with vesicular stomatitis virus. **Int. Immunol.**, Oxford, v. 9, n 11, p.1757-1766, 1997.

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

XIAO, B.G.; LINK, H. Immune regulation within the central nervous system. **J. Neurol. Sci.**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 1-12, 1998.

WAGNER, S.; CZUB, S.; GREIF, M.; VINCE, G.H.; SUSS, N.; KERKAU, S.; RIECKMANN, P.; ROGGENDORF, W.; ROOSEN, K.; TONN, J.C. Microglial / macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. **Int. J. Cancer**, Nova Iorque, v. 82, n. 1, p. 12-16, 1999.

WESSELINGH, S.L.; LEVINE, B.; FOX, R.J.; CHOI, S.; GRIFFIN, D.E. Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 152, n. 3, p. 1289-1297, 1994.

## **ANEXOS**

TABELA 1A. Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por grupo (1 a 7), para o diâmetro de astrócitos.

| Grupo (N) | Média ± Desvio padrão<br>( mm ) | CV (%) |
|-----------|---------------------------------|--------|
| 1 (832)   | 5,7024 ± 0,9862                 | 17,29  |
| 2 (733)   | 5,1060 ± 0,8562                 | 16,77  |
| 3 (839)   | 5,8142 ± 0,9734                 | 16,74  |
| 4 (860)   | 5,6723 ± 0,7933                 | 13,98  |
| 5 (797)   | 6,0905 ± 0,7403                 | 12,15  |
| 6 (799)   | 5,6010 ± 0,7458                 | 13,32  |
| 7 (400)   | 5,3665 ± 0,8122                 | 15,13  |

TABELA 2A. Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para o diâmetro de astrócitos.

| Área (N)  | Média ± Desvio padrão<br>( mm ) | CV (%) |
|-----------|---------------------------------|--------|
| BO (1130) | 5,4739 ± 0,8874                 | 16,21  |
| HC (1367) | 5,7963 ± 0,8825                 | 15,22  |
| TC (1379) | 5,6895 ± 0,8773                 | 15,42  |
| CC (1384) | 5,6102 ± 0,9205                 | 16,41  |

TABELA 3A. Médias gerais observadas e número de informações (n), por grupo (1 a 7) em cada área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para o diâmetro de astrócitos.

| Grupo | Área (mm)              |                        |                        |                        |
|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|       | BO                     | HC                     | TC                     | CC                     |
| 1     | 5,4245±0,8566<br>(205) | 6,1133±0,9067<br>(198) | 5,6023±0,9925<br>(227) | 5,6943±1,0518<br>(202) |
| 2     | 5,0375±0,8429<br>(99)  | 5,1718±0,8022<br>(212) | 5,2829±0,8073<br>(208) | 4,9005±0,9177<br>(214) |
| 3     | 5,4022±1,0632<br>(213) | 6,1112±0,9346<br>(203) | 5,9397±0,9006<br>(199) | 5,8252±0,8474<br>(224) |
| 4     | 5,3520±0,7103<br>(218) | 5,8529±0,7653<br>(218) | 5,8567±0,7894<br>(215) | 5,6286±0,8011<br>(209) |
| 5     | 6,1085±0,7180<br>(159) | 6,1232±0,7176<br>(213) | 6,1525±0,7585<br>(210) | 5,9843±0,7546<br>(215) |
| 6     | 5,7240±0,6856<br>(155) | 5,6641±0,7983<br>(219) | 5,2854±0,6854<br>(209) | 5,7543±0,7014<br>(216) |
| 7     | 4,9251±0,7493<br>(81)  | 5,3413±0,6450<br>(104) | 5,7425±0,7202<br>(111) | 5,3343±0,9176<br>(104) |

TABELA 4A. Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por grupo (1 a 7), para a densidade de astrócitos.

| Grupo (N) | Média ± Desvio padrão | CV (%) |
|-----------|-----------------------|--------|
| 1 (480)   | 24,05 ± 12,77         | 53,10  |
| 2 (390)   | 20,25 ± 8,48          | 41,88  |
| 3 (465)   | 19,27 ± 8,81          | 45,72  |
| 4 (467)   | 17,11 ± 8,10          | 47,34  |
| 5 (447)   | 18,44 ± 8,33          | 45,17  |
| 6 (421)   | 18,86 ± 9,53          | 50,53  |
| 7 (214)   | 19,47 ± 7,28          | 37,39  |

TABELA 5A. Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para a densidade de astrócitos.

| Área (N) | Média $\pm$ Desvio padrão | CV (%) |
|----------|---------------------------|--------|
| BO (611) | 20,71 $\pm$ 10,45         | 50,46  |
| HC (752) | 21,12 $\pm$ 8,70          | 41,19  |
| TC (750) | 13,83 $\pm$ 5,76          | 41,65  |
| CC (771) | 23,12 $\pm$ 10,27         | 44,42  |

TABELA 6A. Médias gerais observadas e número de informações, entre parênteses, por grupo (1 a 7) em cada área (Bulbo olfatório = BO, Hipocampo = HC, Tronco cerebral = TC e Corpo caloso = CC), para a densidade de astrócitos.

| Grupo | Área                       |                            |                           |                            |
|-------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|       | BO                         | HC                         | TC                        | CC                         |
| 1     | 26,37 $\pm$ 13,17<br>(120) | 25,94 $\pm$ 11,85<br>(120) | 14,32 $\pm$ 7,28<br>(120) | 29,57 $\pm$ 12,42<br>(120) |
| 2     | 23,22 $\pm$ 7,28<br>(60)   | 18,87 $\pm$ 6,86<br>(120)  | 15,22 $\pm$ 5,64<br>(90)  | 23,91 $\pm$ 9,95<br>(120)  |
| 3     | 16,55 $\pm$ 9,27<br>(105)  | 20,81 $\pm$ 7,18<br>(120)  | 16,50 $\pm$ 6,93<br>(120) | 22,87 $\pm$ 9,93<br>(120)  |
| 4     | 16,62 $\pm$ 8,19<br>(114)  | 19,16 $\pm$ 6,50<br>(117)  | 10,80 $\pm$ 3,62<br>(120) | 22,06 $\pm$ 8,54<br>(116)  |
| 5     | 21,16 $\pm$ 9,55<br>(87)   | 18,83 $\pm$ 6,48<br>(120)  | 13,06 $\pm$ 4,36<br>(120) | 21,44 $\pm$ 9,46<br>(120)  |
| 6     | 21,61 $\pm$ 9,09<br>(82)   | 23,35 $\pm$ 10,26<br>(104) | 12,85 $\pm$ 4,65<br>(120) | 19,10 $\pm$ 9,83<br>(115)  |
| 7     | 19,84 $\pm$ 9,43<br>(43)   | 21,20 $\pm$ 7,26<br>(51)   | 14,95 $\pm$ 4,55<br>(60)  | 22,27 $\pm$ 5,58<br>(60)   |

TABELA 7A. Médias gerais observadas, número de informações (N) e coeficientes de variação (CV) por grupo (1 a 7), para a densidade de células positivas para a quimiocina MIP-1 $\alpha$ .

| Grupo (N) | Média $\pm$ Desvio padrão | CV (%) |
|-----------|---------------------------|--------|
| 1 (119)   | 17,25 $\pm$ 8,50          | 49,27  |
| 2 (119)   | 19,81 $\pm$ 8,60          | 43,41  |
| 3 (118)   | 22,91 $\pm$ 8,92          | 38,93  |
| 4 (120)   | 22,75 $\pm$ 8,64          | 37,97  |
| 5 (60)    | 10,45 $\pm$ 5,03          | 48,13  |
| 6 (120)   | 10,47 $\pm$ 4,89          | 46,70  |
| 7 (90)    | 12,67 $\pm$ 5,87          | 46,33  |