

Márcia de Carvalho Vilela

**Investigação do recrutamento celular em camundongos selvagens e
TNFR1^{-/-} no modelo experimental de encefalite herpética grave**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre
Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Antônio Lúcio
Teixeira

Belo Horizonte
2008

043 Vilela, Márcia de Carvalho.

V699i Investigação do recrutamento celular em camundongos selvagens e TNFR1^{-/-} no modelo experimental de encefalite herpética grave [manuscrito] / Márcia de Carvalho Vilela. – 2007.

89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Antônio Lúcio Teixeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Herpes Simples - Teses. 2. Vírus do herpes - Teses. 3. Encefalite – Teses. 4. Receptores de Fatores de Necrose Tumoral. 5. Quimiocinas - Teses. 6. Microscopia de fluorescência – Teses. 7. Modelos animais em pesquisa – Teses. I. Teixeira, Antônio Lúcio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 616.523:616.914

Dedico aos meus pais, Afrânio e Josina. Amo vocês!

A minha irmã Cristiane sempre me ajudando.

E a Tia Ângela, meu exemplo.

Agradecimentos

Agradeço ao Antônio pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela liberdade que ele sabiamente conduziu. Você é um ótimo orientador!

Ao Prof Mauro pelo suporte na realização de todos os experimentos.

A Prof Erna que colaborou neste trabalho na parte virológica. Ao Daniel, pessoa fundamental na realização deste e à Gra, sempre simpática e disponível a ajudar.

À Prof Rosa que colaborou neste trabalho e ajudou nas análises histológicas. A Mirna, pela disponibilidade em fazer as lâminas.

Ao Prof Giovanni e à Prof Margarida (*in memoriam*) que ajudaram no credenciamento pontual do Antônio no Departamento de Patologia.

Às Profs Vanessa e Dani Glória sempre dispostas a ajudar.

À Milene que, mesmo pela passagem rápida no laboratório, teve uma participação especial neste trabalho.

Aos amigos do Grupo de Neuroinflamação.

À Norinne, que me ensinou o intravital e sempre esteve presente nos experimentos até mesmo nos finais de semanas tornando-os mais alegres e corados com rosa-choque da rodamina.

Ao David, que mudou a rotina do intravital de três para dez animais por dia, mas soube com muita conversa contornar o cansaço, assim os dias de experimento se tornaram mais interessantes.

À Débora, “IC de luxo”, sempre interessada e cheia de conhecimentos prontos para ajudar. Ainda vamos publicar numa revista 6!

À Fernanda, pelos conselhos. Aos alunos de iniciação Thales, Larissa e Aline.

Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia, Remo, Caio, Dani Sachs, Fávio Amaral, Flavio Lopes, Kátia, Angélica, Landa, Vanessa Mendonça, Rafinha, Carol, Adriana, Daniel, Ildeu, Fernando, David Albanes, Cris, Rodrigo, Vívian, Mila, Marina, Tica, Carol, Ester, Adriano, Letícia pelo convívio e ajuda.

À Val e à Ilma, o laboratório não andaria sem vocês.

Ao Gabriel, pela digitalização dos vídeos do intravital.

As colegas da Pós, Sandra, Fran, Roberta, Vanessa e Chris.

À Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Meu muito obrigado a todos!

Resumo

O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é um patógeno humano que pode causar encefalite grave. O desenvolvimento de modelos experimentais de encefalite herpética causada pelo vírus HSV-1 é de extrema relevância para a compreensão desta condição letal. Camundongos C57BL/6 (wt) foram inoculados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1. Todos os animais desenvolveram sinais clínicos de encefalite e morreram em até 6 dias após infecção (dpi). A microscopia intravital revelou um aumento de leucócitos nas etapas de rolamento e adesão na microcirculação do cérebro dos camundongos wt com 1, 3 e 5 dpi. Foram retirados fragmentos do cérebro para dosagem de quimiocinas, quantificação viral e análise histológica. Constatou-se aumento nos níveis das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, Kc/CXCL1, MIG/CXCL9 no tecido cerebral dos camundongos infectados com o vírus HSV-1. Alta multiplicação viral foi encontrada no sistema nervoso central (SNC) dos camundongos infectados com 1 e 3 dpi. Os achados histológicos revelaram meningite e encefalite focal com um infiltrado predominantemente de células mononucleares. Estabeleceu-se, portanto, um modelo de encefalite herpética grave em camundongos C57BL/6. Não foram detectadas diferenças na curva de sobrevivência e nos títulos virais de camundongos TNFR1^{-/-} infectados pelo HSV-1 em relação aos camundongos selvagens infectados. Houve aumento nas etapas de rolamento e adesão no endotélio cerebral, como também aumento nos níveis de quimiocinas no SNC, mas não foram encontradas diferenças significativas desses parâmetros em relação aos camundongos wt. Pode-se inferir que o receptor 1 para a citocina TNF- α não apresenta papel relevante neste modelo de encefalite herpética.

Palavras-chave: Herpes simplex vírus tipo 1, encefalite, neuroinflamação e TNFR1^{-/-}

Abstract

The Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) is a human pathogen that causes severe encephalitis. The development of experimental models of HSV-1 encephalitis (HSE) is relevant for the comprehension of this potential lethal condition. C57BL/6 (wt) mice were inoculated intracerebrally with 10^4 PFU of neurotropic HSV-1. All animals developed signs of HSE and died until 6 days post infection (dpi). Intravital microscopy revealed an increased leukocyte rolling and adhesion in the brain microvasculature of infected wt mice at 1, 3 and 5 dpi. Fragments of the brain were removed to evaluate cerebral levels of chemokines and viral particles, and histopathological alterations. There was an increase in the levels of the chemokines MCP-1/CCL2, MIP-1/CCL3, RANTES/CCL5, KC/CXCL1 and MIG/CXCL9 in the brain tissue of HSV-1 infected mice. High viral load was found in the central nervous system (CNS) of infected mice with 1 and 3 dpi. Histological analysis demonstrated diffuse meningitis and focal encephalitis characterized by mononuclear cell infiltrates in infected wt mice. A model of severe herpetic encephalitis in C57BL/6 mice was established. When TNFR1 $-/-$ mice were infected with HSV-1, there was no significant difference in the survival curve and the virus load in CNS when compared with infected wt mice. Accordingly, there were increased rolling and adhesion of leukocytes along the brain endothelium wall and high levels of chemokines in the CNS of infected TNFR1 $-/-$ mice but with no difference when comparing with infected wt mice. Therefore the receptor 1 for TNF- α may not play a relevant role in this model of severe herpetic encephalitis.

Keywords: Herpes simplex virus encephalitis, neuroinflammation, chemokines, TNFR1 $^{-/-}$

Abreviaturas

ANOVA = análise de variância

ATCC = Banco de Células Americano

BBB = barreira hematoencefálica

BCG = bacilo de Calmette-Guérin

BSA = soralbumina bovina

CaCl₂ = cloreto de cálcio

MgCl₂ = cloreto de magnésio

CEBIO = Centro de Bioterismo

CETEA = Comitê de Ética em Experimentação Animal

CCL2/MCP-1 = proteína quimioatraente para monócito 1

CCL3/MIP-1 α = proteína quimioatraente de macrófagos, monócitos e linfócitos T CD8+.

CCL5/RANTES = proteína quimioatraente de linfócitos T ativados e eosinófilos

CXCL1/Kc = proteína quimioatraente de neutrófilos

CXCL9/MIG = monocina induzida por IFN- γ

CCR = receptor de quimiocina tipo CC

CSF = fluido cerebroespinal

CXCR = receptor de quimiocina tipo CXC

CMV = citomegalovírus

CMC = carboxi-metil-celulose

dpi = dias após infecção

DNA = ácido desoxirribonucléico

EDTA = ácido etil-diamino-tetra-acético

EAE = encefalomielite auto-imune experimental

ELISA = ensaio imunoenzimático

EPM = erro padrão da média

EBV = Epstein-Barr vírus

g = grama

GAG = glicosaminoglicanos

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ = ácido sulfúrico

HE = coloração Hematoxilina-Eosina

HeLa = linhagem de células imortalizadas derivadas de um câncer cervical

HSV-1 = Herpes simplex vírus tipo 1

HSV-2 = Herpes simplex vírus tipo 2

HHV-6 = Herpesvirus humano 6

HHV-7 = Herpesvirus humano 7

HHV-8 = Herpesvirus humano 8

ICAM= molécula de adesão intercelular

IFN- α = interferon alfa

IFN- β = interferon beta

IFN- γ = interferon gama

Ig = imunoglobulina

IL = interleucina

i.p. = intraperitoneal

i.v. = intravenoso

KCl = cloreto de potássio

LT = linfotóxina

μ L = microlitro

μ g = micrograma

JAM-A =molécula de adesão juncional A

M.O.I = multiplicidade de infecção

MEM = meio mínimo Eagle

MAdCAM-1 = molécula de adesão celular a adressina mucosa vascular – 1

MAC1 = antígeno de macrófago 1

MAPK = proteína cinase p38 ativada por mitógeno

n = número de camundongos

NaCl = cloreto de sódio

NaHCO₃ = bicarbonato de sódio

NaEDTA = EDTA de sódio

Na₃PO₄ = fosfato de sódio

NO = óxido nítrico

iNOS = óxido nítrico sintase induzida

NK = célula “Natural Killer”

KDa = Kilodaltons

°C = graus Celsius

nm = nanômetro

PBS = tampão fosfato de sódio

PECAM = molécula de adesão celular endotélio-plaqueta

PFU = unidade formadora de placa

PSGL1 = ligante 1 de P-selectina

r.p.m. = rotações por minuto

RAS = GTPase homologa RHO

SNC = sistema nervoso central

SNP = sistema nervoso periférico

SFB = soro fetal bovino

Th1 = linfócito T helper tipo 1

Th2 = linfócito T helper tipo 2

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

TNTR 1 = receptor do fator de necrose tumoral 1

TNTR 2 = receptor do fator de necrose tumoral 2

VVO = organela vesículo-vacuolar

VCAM = molécula de adesão em células vasculares

VERO = célula extraída do rim de macaco verde africano

VZV = varicella-zoster vírus

Lista de Figuras

Ilustração 1 Estrutura do vírus HSV-1.....	17
Ilustração 2 Estrutura das diferentes classes de quimiocinas, células nas quais elas agem, exemplos e nomenclatura.	26
Ilustração 3 Etapas do recrutamento de leucócitos	29
Ilustração 4 Esquema representativo do local de inóculo do vírus HSV-1 no crânio dos camundongos.....	40
Ilustração 5 Esquema representativo do local onde foi realizada a janela no crânio dos camundongos, permitindo assim visualização dos vasos da pia -máter.....	41
Ilustração 6 Foto de camundongo C57BL/6 infectado com vírus HSV-1 e sinais clínicos apresentados	51
Ilustração 7 Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com o vírus HSV-1 ou PBS	61
Ilustração 8 Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL/6 e TNFR1 ^{-/-} infectados com o vírus HSV-1.....	69

Lista de Gráficos

Gráfico 1 Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com os inóculos de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 PFU do vírus HSV-1 ou PBS.....	50
Gráfico 2 Massa dos camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.	51
Gráfico 3 Número de leucócitos nas etapas de adesão (A) e rolamento (B) na microcirculação da pia-máter de camundongos infectados com o vírus HSV-1 ou PBS, observado pela técnica de microscopia intravital	53
Gráfico 4 Titulação do vírus HSV-1 pelo método de Tcid50 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1 ou PBS.....	54
Gráfico 5 Níveis da citocina TNF- α e das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, Kc/CXCL1 e MIG/CXCL9 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1	56
Gráfico 6 Número total de leucócitos no sangue periférico de camundongos controles e C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.....	57
Gráfico 7 Número de polimorfonucleares e mononucleares leucócitos no sangue periférico de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.	58
Gráfico 8 Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 e TNFR1 ^{-/-} infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1 ou PBS.	62
Gráfico 9 Número de leucócitos nas etapas de adesão (A) e rolamento (B) na microcirculação da pia-máter de camundongos C57BL/6 (wt) e TNFR1 ^{-/-} infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1, observado pela técnica de microscopia intravital.....	64
Gráfico 10 Titulação do vírus HSV-1 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 (wt) e TNFR1 ^{-/-} infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.	65
Gráfico 11 Produção das quimiocinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Kc/CXCL8 e MIG/CXCL9 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 Análise semi-quantitativa do SNC de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.	60
Tabela 2 Análise semi-quantitativa do SNC de camundongos C57BL/6 e TNFR1 ^{-/-} infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1.	68

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Família <i>Herpesviridae</i>	16
1.2	O vírus Herpes simplex tipo 1	16
1.3	Manifestação clínica	17
1.4	Epidemiologia	19
1.5	Resposta imunológica	19
1.6	TNF- α	21
1.7	Quimiocinas	23
1.9	A barreira hematoencefálica (BBB).....	29
2	Justificativa.....	32
3	Objetivos.....	35
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	Material e métodos	37
4.1	Animais	37
4.2	Vírus.....	37
4.3	Células Vero.....	37
4.4	Multiplicação do vírus	38
4.5	Purificação do vírus	38
4.6	Titulação por contagem de placas	38
4.7	Inoculação dos camundongos	39
4.8	Microscopia intravital em cérebro de camundongo	40
4.9	Contagem de células sanguíneas.....	42
4.10	Preparo de homogenato de cérebro de camundongo.....	42
4.11	Determinação de citocinas por ELISA.....	43
4.12	Titulação por TCID ₅₀	44
4.13	Método histológico	44
4.14	Análise estatística.....	46
4.15	Delineamento experimental	47
5	Resultados.....	49
5.1	Resultados referentes aos experimentos realizados com camundongos C57BL/6	49
5.1.1	Mortalidade	49
5.1.2	Sinais Clínicos.....	50
5.1.3	Interação leucócito-endotélio	52
5.1.4	Carga viral	54
5.1.6	Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue.....	57
5.1.7	Alterações histopatológicas.....	59
5.2	Resultados referentes aos experimentos realizados com camundongos TNFR1 ^{-/-}	62
5.2.1	Mortalidade e sinais clínicos	62
5.2.2	Interação leucócito-endotélio	63
5.2.3	Carga viral	65
5.2.4	Produção de quimiocinas	66
5.2.5	Alterações histopatológicas.....	68
6	Discussão	71
7	Conclusão	80
8	Referências Bibliográficas.....	81

Introdução

1 Introdução

1.1 Família *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* contém mais de 100 membros que infectam desde ostras a humanos. Os herpesvirus que infectam humanos são: herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), varicella-zoster vírus (VZV), citomegalovírus (CMV), Epstein-Barr vírus (EBV), herpesvirus humano 6 (HHV-6), HHV-7 e HHV-8 além do sarcoma de Kaposi. Baseado na análise genômica e características biológicas, os herpesvirus são classificados em três subfamílias: os Betaherpesvirus, Gamaherpesvirus e Alphaherpesvirus que incluem o HSV-1, HSV-2 e VZV. Estes são neurotrópicos e podem estabelecer latência em neurônios do Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Shukla & Spear, 2001).

1.2 O vírus Herpes simplex tipo 1

O vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) tem como características o variado espectro de hospedeiros, neurotropismo, um ciclo de multiplicação curto, rápida disseminação em cultura de células, capacidade de lisar as células infectadas e estabelecer latência após as infecções primárias (Roizman, 1996).

A partícula viral é composta por um cerne elétron-denso, que contém um DNA de fita dupla como material genético (Ilustração 1). No HSV-1, o genoma tem 152 kpb e um alto teor de bases nitrogenadas guanina e citosina (Roizman & Sears, 1996). O capsídeo do HSV-1 é icosaédrico, consistindo de 162 capsômeros medindo aproximadamente 100-110 nm, rodeado por um tegumento amorfo e um envelope com, pelo menos, 11 glicoproteínas e várias proteínas glicosiladas (Roizman, 1996).

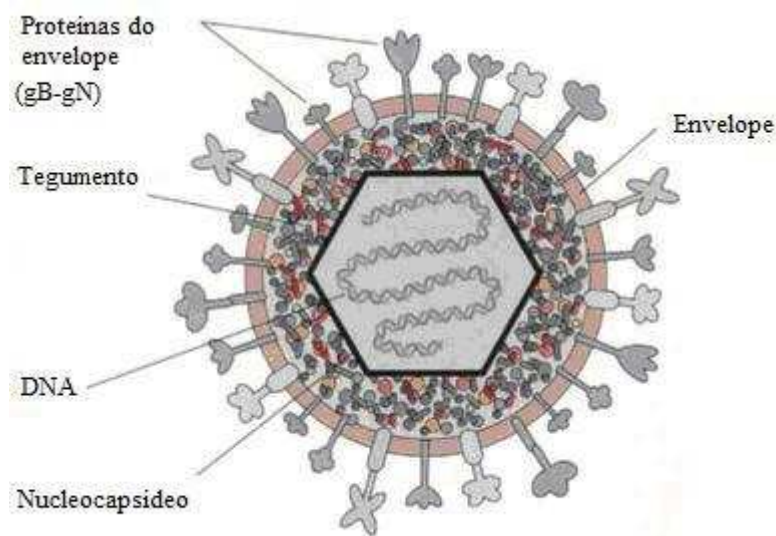


Ilustração 1 Estrutura do HSV-1. A partícula viral é composta por: um envelope: lipídico, com glicoproteínas na superfície, um tegumento, um capsídeo que tem a forma icosaédrica e um genoma de fita dupla de DNA.

1.3 Manifestação clínica

A maioria das infecções por HSV-1 ocorre na infância e se dá como uma infecção inespecífica, muitas vezes assintomática (Gordon, 1990). A transmissão pode ocorrer por secreções ou lesões contaminadas. *In vivo* o HSV-1 se multiplica primeiramente em células epiteliais e depois nos neurônios sensoriais locais, podendo atingir o sistema nervoso central (SNC) (Weir, 2001). Apesar do tropismo por gânglios existe a possibilidade da latência do HSV-1 em tecidos como a córnea (Leisegang, 2001).

A infecção primária pelo HSV-1 tem um período de incubação que varia de 1 a 28 dias. A transmissão do vírus pode também ocorrer durante a fase assintomática, inclusive por crianças e adultos sem histórico de herpes labial (Mole *et al.*, 1997).

Após a infecção primária, o vírus pode entrar em estado de latência em células nervosas e apresentar recorrências (Gordon, 1990). Fatores como estresse, variações hormonais, luz ultravioleta e imunossupressão estão ligados à reativação do vírus em suas diversas formas clínicas (Roizman & Sears, 1996).

O HSV-1 pode causar um grande espectro de doenças, como: gengivostomatite, infecção neonatal e congênita, eczema herpeticum, lesões mucocutâneas, oculares, viscerais e encefalite, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Essas manifestações estão relacionadas com a idade na qual o indivíduo foi infectado e com as características clínicas das populações afetadas (Leisegang, 2001).

A manifestação clínica mais grave é a encefalite herpética que ocorre quando o HSV-1 infecta o tecido cerebral. A maioria desses casos ocorre por reativação do vírus e a rota mais comum para atingir o SNC é feita através do nervo olfatório. Os principais locais de latência são os gânglios trigêmeo e os olfatórios (Whitley, 2006). Contudo, a encefalite pode decorrer de primoinfecção em crianças (Schmutzhard, 2001). Quando neonatos são infectados pelo HSV-1 podem ocorrer dois outros padrões de infecção além da encefalite: o primeiro é uma infecção que é limitada à pele, olhos e boca; e a segunda que é a forma disseminada que envolve fígado, glândula adrenal e pulmão. Esta forma disseminada se assemelha ao quadro observado na sepse bacteriana (Kurt-Jones *et al.*, 2004).

Apesar dos avanços das terapias anti-virais, a encefalite causada pelo HSV-1 é uma das mais devastadoras infecções do SNC com uma taxa de mortalidade acima de 20%, sendo que 50% dos sobreviventes apresentam seqüelas neurológicas graves (Raschilas *et al.*, 2002). As seqüelas mais comuns apresentadas por crianças que sobrevivem às encefalites virais são dificuldades cognitivas, motores e sensoriais, epilepsias, problemas comportamentais e transtornos psiquiátricos (Kneen & Solomon, 2008).

Os danos ocorridos no SNC são em decorrência da multiplicação viral nos neurônios e células da glia, como também da resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro (Sellner *et al.*, 2005; Lokensgard *et al.*, 2002). O sucesso da penetração e multiplicação do vírus HSV-1 no SNC deve-se não somente à quantidade do vírus que chega

ao órgão como também à evasão do vírus à resposta imunológica elaborada dentro do SNC (Tan *et al.*, 2000).

1.4 Epidemiologia

O HSV-1 é um vírus ubíquo e endêmico em todas as sociedades do planeta, de grandes cidades a tribos isoladas, e tem o homem como o único hospedeiro natural (Umene & Sakaoka, 1999). Estimativas indicam que 70% da população mundial é soropositiva para o HSV-1 (Gordon, 1990). Atualmente, com o aumento do número de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e de pacientes submetidos a terapias imunossupressoras, o estudo do HSV-1 vem ganhando importância.

O HSV-1 é a causa mais comum de infecções virais esporádicas do SNC, sendo que ocorrem 2-4 casos/milhão de indivíduos por ano (Schmutzhard, 2001). Um terço dos casos de encefalite acontece em crianças acima de seis meses e adolescentes, e a metade ocorre em adultos acima de 50 anos. Estima-se que um terço das encefalites são decorrentes de primo-infecção e apenas 10% dos pacientes apresentam um histórico de recidiva herpética (Whitley, 2006).

1.5 Resposta imunológica

No curso da infecção, o HSV-1 é detectado pelo sistema imunológico do hospedeiro resultando em uma resposta antiviral. Dessa forma, a infecção aguda é controlada, mas o vírus permanece em estado de latência nos gânglio do sistema nervoso periférico (SNP) o que pode em determinadas situações atingir o SNC (Lang & Nikolic, 2005).

Para a eliminação do vírus é necessário que o hospedeiro desenvolva uma resposta imune inata, assim como uma resposta adquirida específica (Melchjorsen *et al.*, 2002). A primeira linha de defesa, a resposta imune inata, é caracterizada pelo envolvimento de alguns tipos celulares, como macrófagos e células NK. Com o curso da infecção, mecanismos de defesa mais complexos são elaborados, envolvendo a ativação e a regulação de células T. As células T podem diferenciar-se em duas subpopulações de linfócitos que são denominadas Th1 e Th2. Células Th1 produzem citocinas como interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), enquanto células Th2 produzem IL-4 e IL-10. As infecções virais são eliminadas quando o hospedeiro dirige a resposta imune para a proliferação do subtipo Th1 (Biron, 1998). Tratamentos realizados com uma mistura de rIL-4 e rIL-10 aumentaram a gravidade dos casos de mielites em camundongos infectados com HSV-2 (Nakajima *et al.*, 2000). Esse achado indica que as citocinas tipo Th2 têm papel na gravidade da patogênese da infecção pelo HSV no SNC.

A resposta imune contra o HSV-1 é bem complexa e seus componentes ainda não são totalmente esclarecidos. O IFN- γ é um dos principais elementos envolvidos no controle, inibindo a multiplicação do HSV-1 (Vollstedt *et al.*, 2004). As células NK, macrófagos, linfócitos T e linfócitos B também têm um papel importante no controle da infecção pelo HSV-1 (Vollstedt *et al.*, 2004). Os IFN- α/β e IFN- γ mostraram-se essenciais para o controle do vírus HSV-1. (Muller *et al.*, 1994). Foi observado em outro trabalho da literatura que ambos os IFN- α/β são fundamentais no controle do HSV-1 em camundongos C57BL/6 nas primeiras horas de infecção. Esse tempo já é suficiente para ativar e expandir células T, possibilitando uma resposta imune específica. A citocina IFN- γ apresenta um papel como potente regulador da multiplicação celular, influenciando assim a replicação do vírus HSV-1 (Vollstedt *et al.*, 2004).

1.6 TNF- α

Há mais de um século, médicos na Alemanha e nos Estados Unidos observaram que pacientes portadores de câncer desenvolviam necrose hemorrágica e regressão de seus tumores durante os processos infecciosos bacterianos agudos. Com base nessa observação, Coley, em 1893, desenvolveu uma mistura de bactérias mortas ("toxinas de Coley") para o tratamento de neoplasias, mas, na prática, era difícil produzir infecções controláveis. Esse era o único tratamento disponível para o câncer na época (Grunfeld & Palladino, 1990).

Posteriormente, na década de 1970, identificou-se o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) como uma proteína presente no soro de animais tratados com o bacilo de Calmette-Guerin (BCG), que produzia necrose tumoral *in vivo* e possuía atividades citostática e citotóxica em células tumorais *in vitro* (Carswell *et al.*, 1975).

Atualmente é conhecida a existência de duas formas bioativas da citocina TNF que são: um precursor de 26-kDa que é uma forma não-glicosilada ligada à membrana (mTNF) e uma forma de 17-kDa que é a forma solúvel (McDermott, 2001).

O TNF liga-se a dois receptores homotriméricos, o receptor TNF 1 (TNFR1 ou p55) e o receptor TNF 2 (TNFR2 ou p75). Ambos os receptores são amplamente expressos em uma grande variedade de tipos celulares (Wallach *et al.*, 1999). A ligação da citocina com o TNFR1 geralmente resulta na ativação de genes que leva à indução de uma resposta citotóxica e inflamatória, enquanto que a ativação de TNFR2 está associada com a proliferação de timócitos, além da ativação de células T.

A superfamília TNF abrange outros membros, como a linfotoxina (LT). O produto derivado de macrófagos foi denominado TNF- α e o derivado de linfócitos de TNF- β . O TNF é estrutural e funcionalmente semelhante à linfotoxina, proteína produzida por linfócitos

ativados (Willians & Granger, 1968). O TNF- α e a LT podem se ligar aos mesmos receptores na superfície celular e têm várias ações comuns.

O TNF desempenha papel-chave no desencadeamento e na regulação da resposta inflamatória e imunológica em várias infecções virais do SNC, como as encefalites causadas por HIV, HSV, citomegalovírus, vírus do Epstein-Barr e vírus Theiler, com um amplo efeito que vai de proteção à toxicidade (Herbein & O'Brien, 2000).

O TNF- α , produzido por macrófagos, apresenta sinergismo com o IFN- γ e essas duas citocinas agem induzindo a enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Sabe-se que produtos da iNOS são fundamentais para o efeito anti-viral (Biron, 1998). Experimentos realizados em camundongos mostraram que a supressão do TNF- α resultou em rápida progressão da infecção pelo vírus HSV-1 em cultura do gânglio trigêmeo. Além disso, o TNF- α produzido por células do hospedeiro foi essencial para o controle do HSV-1 em experimentos com camundongos infectados (Minagawa *et al.*, 2004).

Contudo, o TNF- α e os produtos induzidos por essa citocina estão também freqüentemente envolvidos na lesão associada a infecções pelo HSV-1 (Fujii *et al.*, 1999). O TNF poderia perturbar o funcionamento do SNC, determinando ainda uma redução da resposta inflamatória (Camelo *et al.*, 2001).

1.7 Quimiocinas

Além das citocinas, as quimiocinas ou citocinas quimiotáticas, que são produzidas durante a infecção viral, também participam ativamente na resposta imune (Melchjorsen *et al.*, 2002). As quimiocinas constituem uma superfamília de mais de 40 pequenas citocinas. Quatro subfamílias das quimiocinas são caracterizadas pela posição do resíduo de cisteína na porção N-terminal da molécula (CXC, CC, C e CX3C) (Ilustração 2). A primeira das duas maiores famílias, a de quimiocinas CXC (que inclui MIP2/CXCL2, IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10), atrai preferencialmente neutrófilos. A segunda família é a de quimiocinas CC, que inclui MIP1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 e RANTES/ CCL5, atraindo e ativando células mononucleares (Figura 2) (Kana *et al.*, 1998; Loetscher *et al.*, 1996).

Além de exercerem papel fundamental na migração de leucócitos, as quimiocinas também participam da diferenciação, desgranulação, ativação celular e em processos como desenvolvimento de órgãos, angiogênese, linfogênese e reparação de tecido (Proudfoot, 2006).

Essas moléculas ligam em receptores com sete domínios transmembrana associados à proteína G com alta afinidade, levando à ativação de cascatas de sinalização intracelular. As quimiocinas também podem fazer uma ligação de baixa afinidade com glicosaminoglicanas (GAG) (Proudfoot, 2006).

O estudo das quimiocinas vem ganhando grande atenção devido à motivação para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A área vem crescendo desde a descoberta que o vírus HIV utiliza o CCR5 como co-receptor para penetrar em células T. Então, esse receptor passou a ser alvo de possíveis de drogas anti-virais. Outra aplicação diz respeito à prevenção e o tratamento de doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias através do aumento ou do bloqueio da ação de quimiocinas (Adler *et al.*, 2006).

Além das quimiocinas atuarem diretamente na ativação e na transmigração de células inflamatórias específicas, parecem exercer papel crítico nas infecções virais do SNC (Sellner *et al.*, 2005).

A infecção *in vitro* de macrófagos com o HSV-1, mostrou que RANTES/CCL5 é a principal quimiocina produzida por esse tipo celular (Melchjorsen *et al.*, 2002). RANTES/CCL5 é uma quimiocina que age sobre células T de memória, células dendríticas e monócitos via o receptor CCR5 (Lee *et al.*, 1999). Um estudo usando um modelo viral para esclerose múltipla revelou que a neutralização de RANTES/CCL5 reduziu os danos neuronais por diminuir o acúmulo de células T no SNC (Glass *et al.*, 2004). Em camundongos CCR5^{-/-}, observou-se redução do infiltrado de macrófagos, além da diminuição na desmielinização em relação a camundongos CCR5^{+/+} em um modelo de hepatite que leva à inflamação do SNC (Glass *et al.*, 2001). Um estudo por meio de microscopia intravital revelou uma significativa redução da etapa de adesão na microvasculatura cerebral de camundongos C57BL/6 com encefalite autoimune experimental (EAE) submetidos ao tratamento com anticorpo anti-RANTES/CCL5 (dos Santos *et al.*, 2005).

Para o melhor entendimento do papel da quimiocina RANTES/CCL5 no processo de recrutamento de leucócitos em um foco inflamatório, pode-se usar Met-RANTES, um antagonista do receptor CCR5. Proudfoot e colaboradores (1996) mostraram que, quando RANTES/CCL5 era expresso heterologicamente em *Escherichia coli*, ocorria retenção de uma metionina no grupamento amino-terminal. A nova proteína formada se liga ao receptor CCR5, mas é completamente inativa do ponto-de-vista do efeito biológico. Assim, Met-RANTES pode inibir tanto o efeito da quimiocina RANTES/CCL5 quanto da MIP-1 α /CCL3 (Proudfoot *et al.*, 1996). No modelo de glomerulonefrite experimental, por exemplo, o tratamento com Met-RANTES causou uma redução significativa no recrutamento celular (Lloyd *et al.*, 1997).

Foram descritos os papéis de MIP-1 α /CCL3 e MIP-2/CXCL2 na hipersensibilidade ao HSV-1, sendo que o tratamento com anticorpos anti-MIP-2/CXCL2 e anti-MIP-1 α /CCL3 reduziu drasticamente a migração de leucócitos para a região infectada (Tumpey *et al.*, 2002). A migração de células NK e linfócitos T para a córnea, retina e gânglio trigêmeo após a infecção com o HSV-1 estão diretamente relacionadas à presença de IP10/CXCL10. O tratamento de camundongos com anti-CXCL10 levou a uma diminuição do infiltrado celular na córnea e retina (Carr *et al.*, 2003).

Camundongos deficientes para o receptor CXCR3, apesar de apresentarem um aumento do título de HSV-1 tanto no gânglio trigêmeo quanto no cérebro, tiveram uma maior produção de CCL5/RANTES e MIG/CXCL9 no trigêmeo e de CCL5/RANTES e IP10/CXCL10 no tronco encefálico; além de uma diminuição na mortalidade destes animais (Wickham *et al.*, 2005).

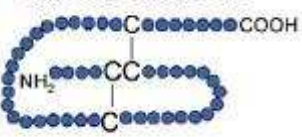
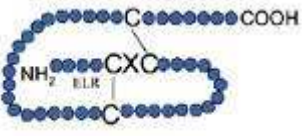
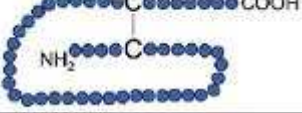
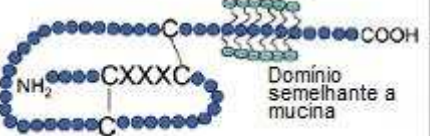
Subfamília	Age em	Sub-grupo	Nome	Outros nomes
Quimiocinas CC 	Monócitos Eosinófilos Basófilos Linfócitos T Células NK Células dendríticas	MCP/Eotaxin (alergénico)	CCL1 CCL2 CCL7 CCL8 CCL11 CCL12 CCL13 CCL24 CCL26	I-309 MCP-1 MCP-3 MCP-2 Eotaxin MCP-5 ⁹ MCP-4* Eotaxin-2 Eotaxin-3*
		Inflamatório	CCL3 CCL4 CCL5 CCL6 CCL9 CCL10 CCL18	MIP-1 α MIP-1 β RANTES C10* MIP-1 γ * CCL10 ⁹ MIP-4*
		HCC	CCL14 CCL15 CCL16 CCL23	CC-1* Leukotactin-1* LEC MPIF-1*
		Desenvolvimento	CCL17 CCL22 CCL25	TARC MDC TECK
		Homeostático	CCL19 CCL20 CCL21	ELC LARC SLC
		Outros	CCL27 CCL28	ESKine MEC
Quimiocinas CXC 	Neutrófilos	ELR+	CXCL1 CXCL2 CXCL3 CXCL5 CXCL6 CXCL7 CXCL8 CXCL15	GRO α GRO β GRO γ ENA-78 GCP-2 NAP-2 IL-8 Lungkine
	Linfócitos Monócitos	ELR-	CXCL4 CXCL9 CXCL10 CXCL11 CXCL12 CXCL13 CXCL14 CXCL16	PF-4 MIG IP-10 I-TAC SDF-1 BCA-1 BRAX CXCL16
Quimiocinas C 	Linfócitos		XCL1 XCL2	Lymphotactin α Lymphotactin β *
Quimiocinas CX₃C 	Linfócitos T Monócitos Células NK		CX3CL1	Fractalkine

Ilustração 2: Estrutura das diferentes classes de quimiocinas, células nas quais elas agem, exemplos e nomenclatura.

1.8 Recrutamento celular

O recrutamento de leucócitos do sangue para o espaço intersticial é um mecanismo chave do processo inflamatório e tem sido descrito na patogênese de várias doenças. É um processo multifásico e coordenado, envolvendo várias etapas: rolamento, adesão e transmigração (Ilustração 3) (Springer, 1995).

O processo tem início com a captura (“tethering”) do leucócito pelo endotélio ativado com participação de molécula P-selectina. Os leucócitos deslocam do centro do vaso até a periferia do endotélio. Uma vez capturado o leucócito passa por uma condição transiente de adesão e dar-se então a etapa do rolamento, os leucócitos diminuem sua velocidade e rolam sobre a camada de células endoteliais. Esse rolamento é mediado principalmente por uma família de moléculas de adesão, glicoproteínas conhecidas como selectinas (P-selectina, E-selectina e L-selectina) e são capazes de interagir com ligante 1 de P-selectina (PSGL1) e outros ligantes glicosilados. A molécula P-selectina tem papel crítico na etapa de rolamento. (McEver & Cummings, 1997; Kansas, 1996).

A expressão de E-selectina das células endoteliais e de CD18 tem participação fundamental no rolamento lento, que é a etapa seguinte ao rolamento (Jung & Ley, 1999).

Em seguida, aqueles leucócitos que rolaram podem ser ativados e se aderirem ao endotélio por integrinas (CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$). As integrinas se ligam a moléculas da superfamília das imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1 e MAdCAM-1).

Nas últimas décadas, novos conhecimentos vieram agregar mais informações sobre estrutura e sinalização durante o processo de ativação das integrinas (Laudanna *et al.*, 2002; Kinash, 2005). O aumento da afinidade das integrinas corresponde a mudanças

conformacionais em sua estrutura. Estas mudanças levam a um aumento na energia de ligação-ligante e uma diminuição na taxa de dissociação da ligação (Ley *et al.*, 2007).

Finalmente, o leucócito pode transmigrar na presença de um gradiente quimioatraente exógeno (Huang *et al.*, 1992). A membrana do leucócito emite saliência com as células endoteliais e esta união intercelular permite a ligação de ICAM1 com a molécula MAC1 (antígeno de macrófago 1). Esta ligação está associada com o aumento intracelular de Ca^{2+} , ativação da MAPK (proteína cinase p38 ativada por mitógeno) e também a ativação da RAS (GTPase homóloga RHO). Estes mecanismos levam coletivamente a ativação da miosina originando um aumento da contração do endotélio-leucócito, como resultado tem-se uma abertura de um espaço interendotelial. Estes eventos podem promover à migração de leucócitos através das junções endoteliais (rota paracelular) como também a migração pode ocorrer dentro da célula endotelial (rota transcelular) (Ley *et al.*, 2007).

A migração paracelular envolve a participação da molécula VE-caderina (caderina expressa por endotélio), da molécula JAM-A (molécula de adesão juncional A), ICAM-2 (molécula de adesão intercelular), CD99 além de um compartimento de membrana intracelular que contém PCAM-1 (molécula de adesão celular endotélio-plaqueta) (Ley *et al.*, 2007).

Já a migração transcelular, ocorre nas partes mais finas da célula endotélio, o que permite uma menor distância de transmigração. A ligação de ICAM-1 e LFA-1 leva a movimentação de ICAM-1 para regiões ricas em actina e cavéola. A associação de ICAM-1 e cavéola geram várias organelas vesiculo-vacuolar (VVO), que permitem a formação de um canal intracelular para o leucócito migrar (Ley *et al.*, 2007).

No tecido, os leucócitos podem eliminar o agente causador da lesão e/ou infecção.

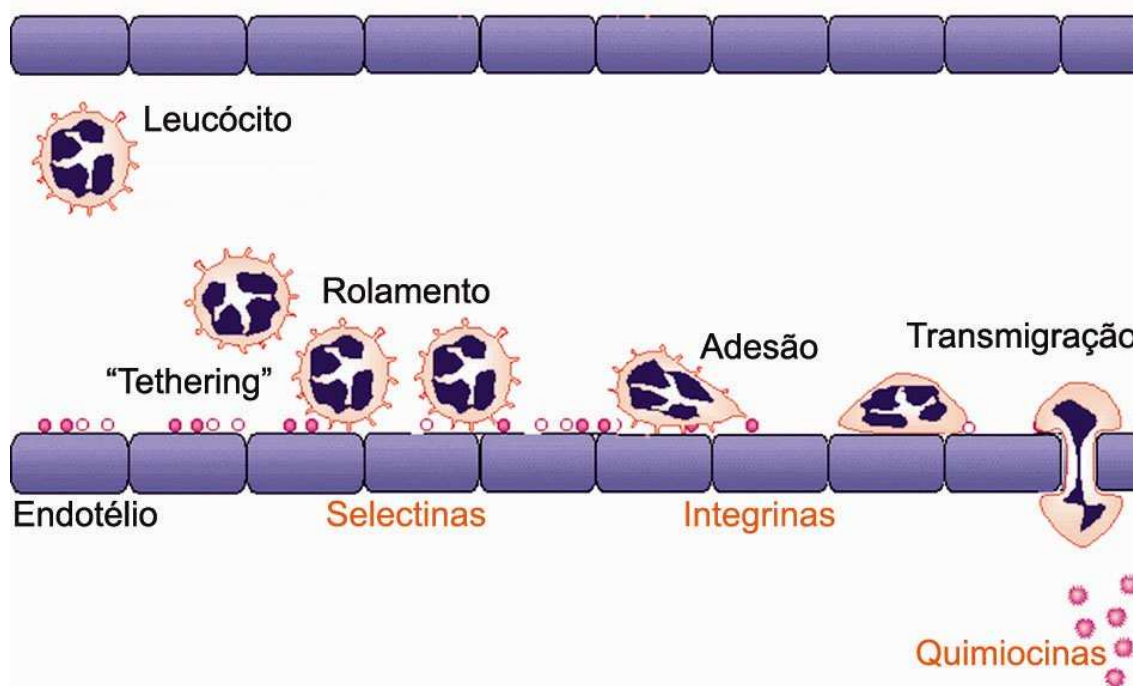


Ilustração 3: Etapas do recrutamento de leucócitos. Inicialmente o leucócito é capturado (tethering) pelas células endoteliais. Em seguida ocorre a etapa do rolamento e rolamento lento, mediado pelas selectinas e ativação realizada pelas quimiocinas. Na sequência os leucócitos aderem ao endotélio, mediado pelas integrinas. E por último, o leucócito muda sua conformação e é capaz de transmigration o endotélio

1.9 A barreira hematoencefálica (BBB)

Os capilares da vasculatura cerebral apresentam uma integridade iônica e bioquímica que é possível devido à existência de junções interendoteliais chamadas “tight junctions”. Muitas são as proteínas formadoras desta junção dentre elas podemos citar algumas como: moléculas de adesão juncional (JAM), ocludina e claudina. Essas junções não permitem a passagem das células circulantes e macromoléculas para o SNC. Outra característica das células endoteliais no SNC é a raridade de vesículas endocíticas e fenestrações (Pachter *et al.*, 2003). Os astrócitos contribuem para a formação de uma barreira física através da emissão de pés sobre o endotélio como também produzindo fatores tróficos

que participam da manutenção deste equilíbrio (Haseloff *et al.*, 2005). Todas essas propriedades encontradas no endotélio microvascular cerebral são coletivamente conhecidas como barreira hematoencefálica (BBB).

A passagem de moléculas pela BBB pode ocorrer através das células ou entre células adjacentes. O caminho transcelular envolve mecanismos de difusão passiva para substâncias lipofílicas, passagem por receptores e transcitose. Já a passagem paracelular, ocorre devido a diferenças de gradientes, o que permite a movimentação de íons e solutos entre as células (Petty & Lo, 2002).

A migração de leucócitos pela BBB tem importante papel na resposta imune do hospedeiro contra infecções do SNC (Ransohoff *et al.*, 2003).

Em modelos experimentais e casos humanos de encefalite pelo vírus HSV-1, observam-se alterações na microcirculação cerebral, quebra da barreira hematoencefálica e destruição da matriz extracelular por metaloproteinases (Barnett *et al.*, 1988). Os mecanismos que levam à quebra da BBB durante o curso das encefalites virais ainda permanece obscuro (Olsen *et al.*, 2007).

Justificativa

2 Justificativa

O HSV-1 é a maior causa de infecções esporádicas fatais do SNC em humanos (Schmutzard, 2001). A progressão da doença causada pelo HSV-1 está muito ligada à resposta imune do hospedeiro, podendo esta determinar o controle da infecção ou o agravamento do quadro clínico do paciente (Stumpf *et al.*, 2000).

Para alcançar um tratamento efetivo contra a encefalite herpética é necessário um maior entendimento da resposta imunológica do hospedeiro durante a evolução da doença (Rempel *et al.*, 2005). Os eventos que ocorrem dentro do SNC, depois da exposição do vírus, precisam ser estudados e a disponibilidade dos camundongos *knock out* possibilita o estudo da relação parasito-hospedeiro.

Diante da gravidade dos casos de encefalite faz-se necessário a padronização de modelos experimentais para o melhor entendimento desta doença. Este trabalho visou padronizar o modelo de encefalite por infecção intracraniana com o vírus HSV-1 em camundongos selvagens C57BL/6, focando o estudo em eventos inflamatórios como: o processo de recrutamento celular, a produção de quimiocinas e as alterações histológicas.

O TNF- α é um dos principais elementos envolvido no controle da infecção aguda pelo HSV-1 juntamente com células NK, macrófagos, linfócitos T e linfócitos B (Roizman, 1996). O TNF- α manifesta ações através da ativação de dois receptores, o TNFR1 e o TNFR2. Ambos apresentam diferentes domínios intracelulares e seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados (Bazzoni & Beutler, 1996; Hehlhans *et al.*, 2002). Assim, a segunda parte deste trabalho consistiu em estudar o papel do receptor 1 para citocina TNF- α na resposta imune face à infecção do SNC pelo vírus HSV-1. Dessa forma, foram avaliados os mesmos parâmetros acima descritos para camundongos C57BL/6 em animais geneticamente

deficientes (*knock out*) do receptor 1 para a citocina TNF (TNFR1^{-/-}) durante a encefalite herpética.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estabelecer um modelo de encefalite e investigar parâmetros inflamatórios no SNC de camundongos C57BL/6 em resposta à infecção pelo vírus HSV-1, além de estudar o papel do receptor TNFR 1 neste modelo de encefalite herpética.

3.2 Objetivos específicos

- Acompanhar o desenvolvimento de encefalite em animais C57BL/6 infectados com diferentes inóculos do vírus HSV-1;
- Estudar parâmetros inflamatórios como: interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral, quantificação de quimiocinas e citocina e verificação de alterações histopatológicas no SNC de camundongos controle e infectados com o HSV-1.
- Investigar esses parâmetros inflamatórios e histopatológicos em animais TNFR1^{-/-} infectados pelo HSV-1.

Material e métodos

4 Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados neste trabalho camundongos selvagens C57BL/6 machos com idade entre 5 a 7 semanas, obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Camundongos geneticamente deficientes do receptor 1 para a citocina TNF (TNFR1^{-/-}) foram generosamente cedidos pela Prof. Leda Quercia Vieira do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e água.

A metodologia apresentada a seguir foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) sob o número de protocolo N° 186/2006.

4.2 Vírus

A amostra viral HSV-1, cepa EK isolada de paciente humano, foi obtida do Laboratório de Vírus ICB/UFMG.

4.3 Células Vero

Células Vero (epitélio de rim de macaco verde africano) provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) foram crescidas a 37° C em meio mínimo de *Eagle* (MEM) suplementado com soro fetal (SFB) a 5% e em estufa de CO₂. Essas células foram utilizadas para multiplicação, detecção e titulação do HSV-1.

4.4 Multiplicação do vírus

Células Vero foram infectadas com a multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 1 do estoque de semente e, 24h depois, quando o efeito citopático atingiu de 75 a 100% das células, o sobrenadante foi guardado sob refrigeração. Parte do sobrenadante foi retirado para posterior titulação.

4.5 Purificação do vírus

O sobrenadante foi precipitado com uma solução saturada de sulfato de amônio em banho de gelo com o auxílio de um gotejador, até atingir 60% do volume final. A solução sulfato de amônio e sobrenadante foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos a 4° C. O sedimento resultante foi ressuspenso em 10mL de TRIS 10mM, pH 8,0. Foi preparado um colchão de sacarose 36% em tubo de ultra centrífuga com 10 ml de solução de sacarose 36% e acrescido de 26 ml da suspensão final. A amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 2 horas a 4° C ultra centrífuga Sorvall. O sedimento homogeneizado em 1 mL de TRIS 10mM e submetido a uma nova centrifugação em colchão de sacarose como o anterior. O sedimento foi coletado e transferido para outro tubo de ultra centrífuga completando o volume para 36 ml de TRIS 10 mM pH 8,0 e, então, foi centrifugado por 1 hora a 20000 rpm a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado em 300 µl de TRIS 10mM pH 8,0. A amostra foi aliquoteada para posterior titulação.

4.6 Titulação por contagem de placas

Para a titulação do vírus purificado, 2×10^6 células Vero foram implantadas por poço em placas de 6 poços, 24 horas antes da infecção em meio MEM com 1% SFB. Diferentes diluições seriadas do vírus em base exponencial de 10 foram adsorvidas por 1 hora em diferentes poços contendo as células, sob homogeneização de 15 em 15 min, e então, adicionadas 3 ml de MEM contendo 1,5% de Carboxi-metil-celulose (CMC) (GIBCO BRL, USA). Após 72 horas, a monocamada foi fixada com formalina a 10% em PBS, corada com Cristal Violeta. O número de placas contado na diluição que apresentou entre 30 e 300 placas de lise. O título foi expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ml).

4.7 Inoculação dos camundongos

Para a padronização da melhor dose do vírus HSV-1 camundongos foram anestesiados por via intra-peritoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg) e ketamina (150 mg/Kg) e posteriormente submetidos a diferentes inóculos. Os camundongos foram divididos em cinco grupos e infectados por via intracraniana com as seguintes doses: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 PFU do vírus HSV-1. Todos os animais foram inoculados aproximadamente no mesmo local. Utilizando uma seringa para insulina BD (0,3mm: 0,8 mm), o inóculo de 10 μ l foi feito no lado direito da sutura sagital na direção do olho (Ilustração 4).

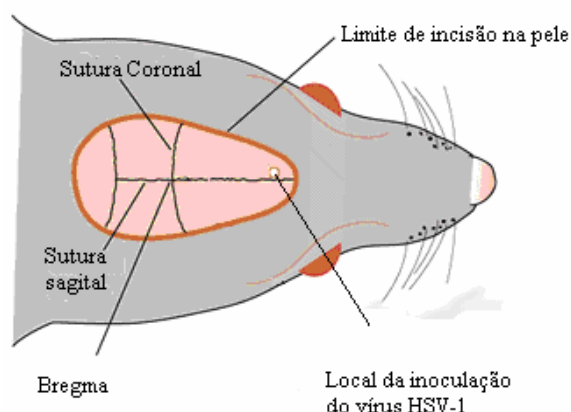


Ilustração 4 Esquema representativo do local de inóculo do Vírus HSV-1 no crânio dos camundongos

4.8 Microscopia intravital em cérebro de camundongo

Os animais foram anestesiados via intra-peritoneal com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, Rompun, Bayer) e ketamina (150 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP). A veia da cauda foi canulada para administração do corante rodamina 6G Sigma (0.3mg/kg). A rodamina é um corante de células que acumula nas mitocôndrias e possibilita a visualização do leucócito mesmo na presença de uma alta velocidade de fluxo. A temperatura corporal dos animais foi mantida a 37^o C com o auxílio de uma manta térmica (Fine Science Tools, FST, Canadá) colocada em contato com o corpo do animal. A craniotomia foi realizada na região parietal, utilizando uma broca de ponta fina (Ilustração 5). A dura-máter e a aracnóide foram removidas, sendo formada uma janela para visualização dos vasos sanguíneos da pia-máter. Esse procedimento não rompe a barreira vascular da microvasculatura cerebral. A superfície do cérebro foi continuamente superfundida com uma solução de fluido cerebrospinal artificial (composição em mmol/L: NaCl 132, KCl 1.95, CaCl₂ 1.71, MgCl₂ 0.64, NaHCO₃

24.6, dextrose 3.71 e uréia 6.7) à temperatura de 37°C, pH 7.35, que manteve a preparação estável.

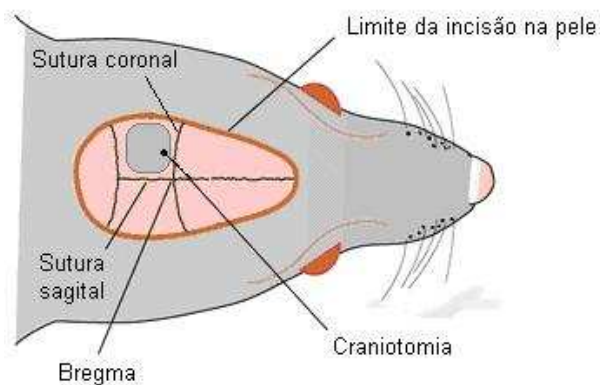


Ilustração 5 Esquema representativo do local onde foi realizada a janela no crânio dos camundongos, permitindo assim visualização dos vasos da pia -máter

Um microscópio (Olympus BX40), com objetiva 10X, foi utilizado para observar os eventos microcirculatórios nos vasos cerebrais. Após a localização dos vasos a serem estudados, injetou-se, por via intravenosa, uma pequena quantidade (0.5mg/kg) do corante rodamina. A fluorescência associada à rodamina 6G (Sigma) foi visualizada com epi-iluminação a 510-560 nm, usando um filtro de emissão de 590 nm. Uma câmera de vídeo (Optronics) projetou as imagens que foram gravadas em vídeo-cassete (VHS, Semp Toshiba, modelo x685) para posterior análise do número de leucócitos em rolamento e adesão.

O rolamento de leucócitos foi definido como células movendo a uma velocidade menor que o fluxo sanguíneo. Foi considerado leucócito rolando todos os que passaram por uma linha imaginária transversal ao vaso durante 30 segundos. Leucócitos foram considerados aderidos ao endotélio que permaneceram estacionários por um período de 30 segundos em um fragmento de vaso de aproximadamente 100µm. Os dois parâmetros foram mensurados em três vasos diferentes para cada janela de observação e feitos uma média para cada animal. O

rolamento e a adesão leucocitária foram expressos como número de células/minuto e células/100µm, respectivamente.

4.9 Contagem de células sanguíneas

Após o término da microscopia intravital, 5µl do sangue dos camundongos foram diluído em 95µl solução de Turk para contagem do número total de células em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 10X. O valor encontrado foi multiplicado pela diluição e o fator de correção da câmara de Neubauer resultando no número total de leucócitos.

Um esfregaço foi feito e corado com Giemsa e May-Gruwald para a identificação dos tipos celulares presentes nos animais infectados e controles. Os esfregaços sanguíneos foram examinados no microscópio óptico, em objetiva de imersão.

A contagem diferencial dos diferentes tipos celulares foi estimada em 100 células, com auxílio de um contador diferencial. O cálculo do número diferencial dos tipos celulares presentes no sangue periférico foi realizado da seguinte forma: o valor obtido na contagem foi multiplicado pelo número total de leucócitos dividido por 100.

4.10 Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

O hemisfério direito do cérebro dos animais infectados e controles foram retirados e devidamente acondicionados e estocados a -20°C . As amostras foram pesadas (100 mg) e colocadas em 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio

0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89 g diluídos em 1 litro) para preparação do homogenato. Os tecidos foram macerados por um homogenizador próprio em uma velocidade ótima e a solução resultante foi centrifugada a 10000rpm/10min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a -20°C até o uso.

4.11 Determinação de citocinas por ELISA

Os kits para ELISA de camundongo para quimiocinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

As concentrações foram avaliadas no sobrenadante do homogenato cerebral em diluição 1:3 em tampão fosfato:albumina bovina (PBS:BSA 0,1%). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µl de uma solução contendo concentração adequada do anticorpo captura específico diluídos em PBS, pH 7.4. Essa solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C e, posteriormente, lavada 5 vezes com PBS/Tween 0,1% em um lavador de placas automático. Logo após, foram adicionados 200 µl de solução de bloqueio PBS:BSA 1%. O tempo de bloqueio foi de 2 h. Foram adicionados os padrões das quimiocinas em concentração conhecida e as amostras. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4°C. Foram adicionados então, 100 µl de uma solução de anticorpo de detecção que foi incubado por 1 h. Transcorrido esse período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (1:4000). Após 30 min, a placa foi novamente lavada e depois adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD,

Sigma) e H₂O₂ (Merck). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Mac 190) com filtro para o comprimento de onda de 492 nm.

4.12 Titulação por TCID₅₀

Para titulação do vírus HSV-1 em um quarto de cérebro dos camundongos retirado após a microscopia intravital, células Vero foram implantadas em microplacas de 96 cavidades na concentração de 60.000 células por poço, com meio MEM 5% de SFB. Após 24 horas, o meio das células foi retirado e acrescentado 100 µl das diluições do homogenato do fragmento de cérebro (diluições de 10⁻¹ até 10⁻¹⁰), feitas em meio MEM 1% SFB em banho de gelo. A coluna da placa correspondente ao controle de células recebeu 100µl de MEM 1% SFB em substituição as diluições do vírus. Após a homogeneização do vírus, a placa foi incubada em estufa a 5% de CO₂, a 37°C. A leitura das placas foi efetuada a cada 24 horas durante 5 dias. O título viral foi calculado pelo método de REED & MUENCH (Lennette & Schmidt, 1979).

4.13 Método histológico

Para analisar as alterações provocadas pela multiplicação vírus HSV-1 no SNC foram realizados cortes histológicos. Após a realização da microscopia intravital os animais foram sacrificados e um quarto do hemisfério esquerdo do cérebro foi coletado e incluído em uma solução de formalina 10% tamponado. A solução de formol permitiu a preservação da morfologia e composição tecidual. Todos os fragmentos foram submetidos à desidratação,

com a finalidade de remover a água presente nos mesmos. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (álcoois 70, 80, 90 e absoluto) sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina, contendo os fragmentos do cérebro, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos cortes seriados com 4 micrômetros (4 μ m) de espessura. Cada corte foi colocado em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e logo depois as lâminas foram colocadas na estufa para secarem a temperatura de 60° C.

A coloração de rotina HE (Hematoxilina-Eosina) foi realizada nas lâminas com cortes do tecido cerebral para uma observação geral das alterações histopatológicas.

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em dois banhos de xilol, de duração de 15 minutos cada, para desparafinização. Em seguida estas lâminas foram imersas em banhos de álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70%, e água sendo cada um dos banhos de 5 minutos para hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. A seguir foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram imersas em três banhos de álcool absoluto rapidamente e levadas à estufa a 60° C por alguns minutos para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan (Merck) e lamínula.

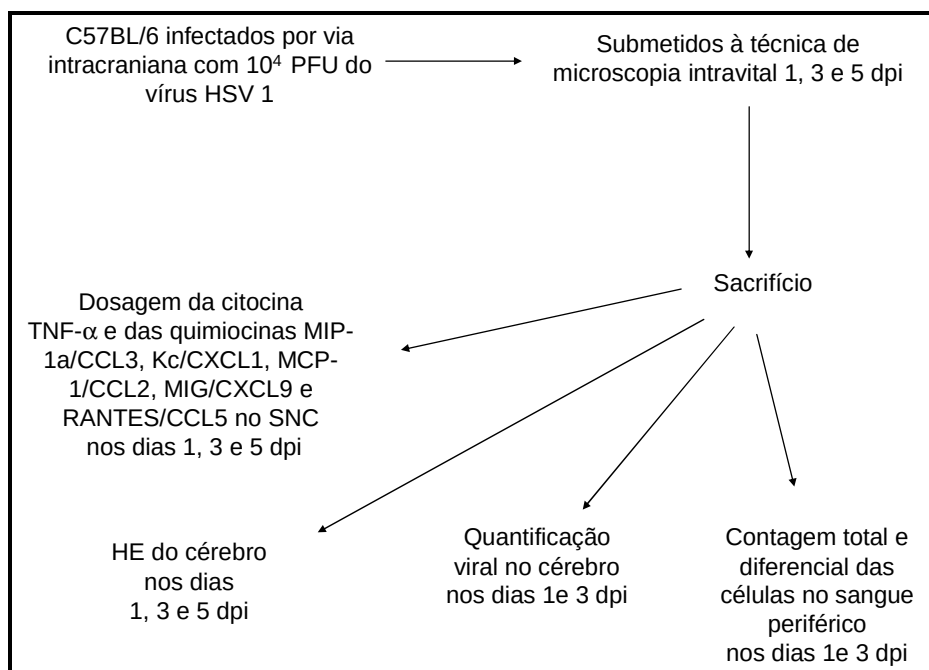
As lâminas coradas pela HE foram avaliadas utilizando-se a objetiva de 10, 20 e 40X. Nos cortes histológicos o processo inflamatório foi avaliado de forma qualitativa e caracterizado como: ausente, discreto, moderado ou intenso de acordo com a característica da área comprometida. Nos vasos foram avaliados o acúmulo de leucócitos também caracterizados como discreto, moderado ou intenso de acordo com a quantidade de vasos comprometidos.

4.14 Análise estatística

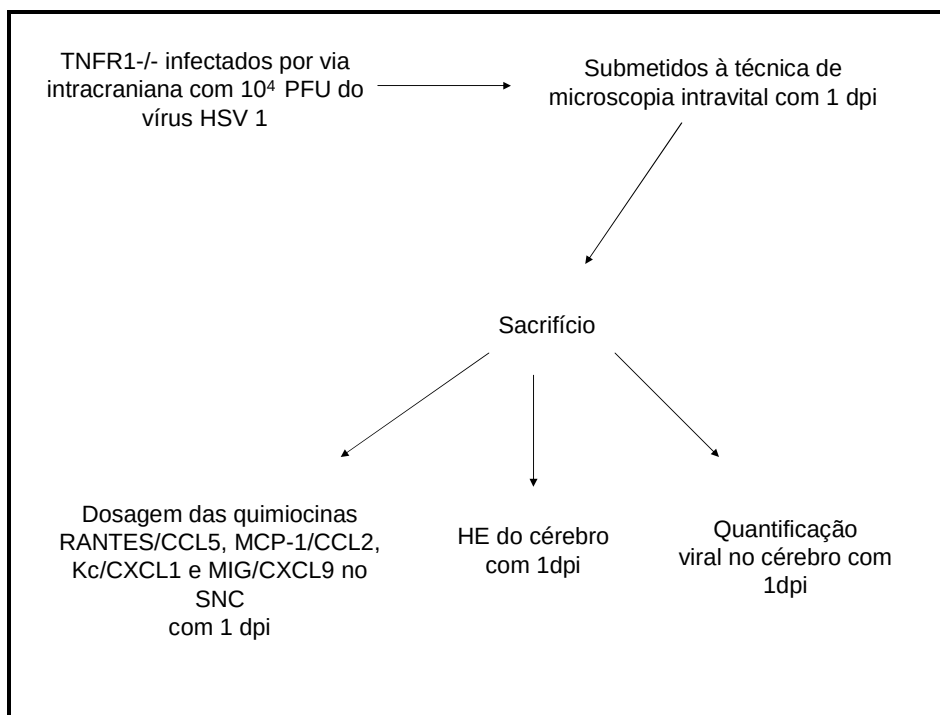
Os dados foram apresentados com média $\pm$ DP. Os testes *t*-studente e ANOVA, com correção Tukey, foram utilizados para comparações múltiplas. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Foi utilizado o teste estatístico Kaplan-Meier, para as curvas de sobrevida.

4.15 Delineamento experimental

Camundongos C57BL/6



Camundongos TNFR1^{-/-}



Resultados

5 Resultados

5.1 Resultados referentes aos experimentos realizados com camundongos C57BL/6

5.1.1 Mortalidade

Inicialmente, camundongos C57BL/6 foram infectados por via intracraniana com os inóculos 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 PFU do vírus HSV-1. Os animais foram acompanhados diariamente para a realização das curvas de sobrevivência e, assim, poder determinar a melhor dose para ser utilizada neste trabalho (Gráfico 1). As três primeiras doses mostraram padrão similar quanto à letalidade, embora o inóculo de 10^4 tenha determinado uma resposta mais rápida. Assim este foi escolhido para ser utilizado em todo o trabalho.

Pode-se observar que os camundongos C57BL/6 após infecção intracraniana com 10^4 PFU começaram a morrer no primeiro dia após infecção, chegando a 80% de mortalidade no terceiro dia após infecção. No experimento mostrado, no 4º dia após infecção com o vírus HSV, todos os animais estavam mortos. Em contrapartida, os camundongos que foram inoculados com PBS não morreram. O gráfico 1 demonstra a alta taxa de mortalidade após a infecção com o vírus HSV-1.

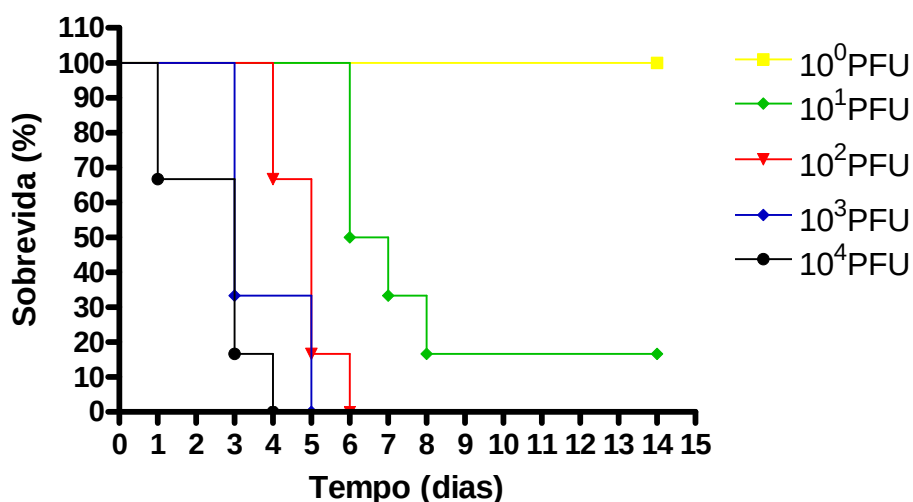


Gráfico 1 Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com os inóculos de 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 PFU do vírus HSV-1 ou PBS. Os animais foram acompanhados ao longo do tempo (dias). Após a infecção com o vírus HSV-1 todos os camundongos apresentaram alta mortalidade. Camundongos controles, inoculados com PBS, apresentaram 100% de sobrevivência durante todo o tempo avaliado. Foram realizados dois experimentos com um $n = 5$ camundongos C57BL/6 por grupo. Teste estatístico usado: Kaplan-Meier. $p < 0,05$

5.1.2 Sinais Clínicos

Mediu-se a massa corporal dos camundongos C57BL/6 diariamente. Camundongos infectados com o vírus HSV-1 apresentaram uma rápida perda de massa corporal, sendo significativa em relação à massa inicial dos animais (Gráfico 2). Todos os animais infectados apresentaram sinais característicos da encefalite como: perda de peso, paresia (fraqueza) dos membros e alterações posturais (Ilustração 6). No estágio final da doença, os camundongos apresentavam movimentos estereotipados, como andar em círculos.

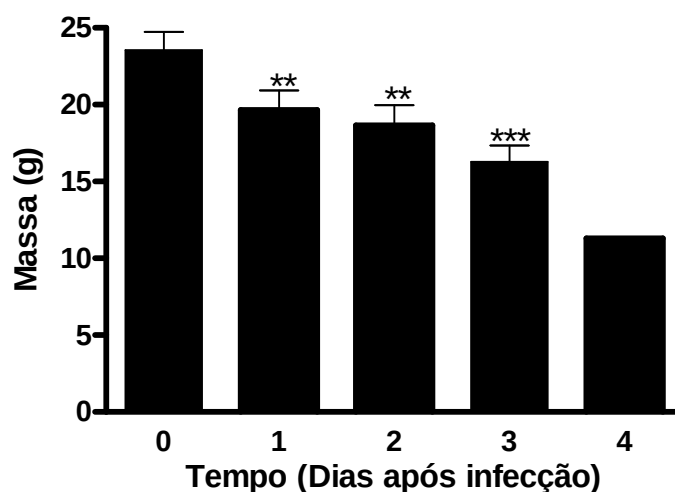


Gráfico 2 Massa dos camundongos C57BL/6 ($n = 5$) infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1. Os animais foram acompanhados ao longo do tempo (dias). Após a infecção com o vírus HSV-1 os camundongos apresentaram perda de massa corporal ao longo do curso da infecção. Foi realizado o teste *t-Student* pareado para observar a variação de peso. Os valores representam média e $\pm$ DP da massa por dia e considerados estatisticamente significativo. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.



Ilustração 6: Foto de camundongo C57BL/6 com 3 dias após infecção por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1. Os sinais clínicos apresentados pelo camundongo na foto são: pêlos eriçados e paralisia .

5.1.3 Interação leucócito-endotélio

Para avaliar as interações leucócito-endotélio na microvasculatura da pia-máter, os camundongos infectados com 10^4 PFU e controles passaram por um processo cirúrgico. Foi realizada uma janela no crânio para a exposição dos vasos sanguíneos. Os animais foram submetidos à técnica de microscopia intravital nos dias 1, 3 e 5 após infecção.

Camundongos C57BL/6 infectados com o vírus HSV-1 apresentaram aumento no número de células nas etapas de rolamento e adesão leucocitária no endotélio cerebral (Gráfico 3). Os valores encontrados nos camundongos C57BL/6 infectados com o vírus HSV-1 foram significativamente diferentes quando comparados aos camundongos controles.

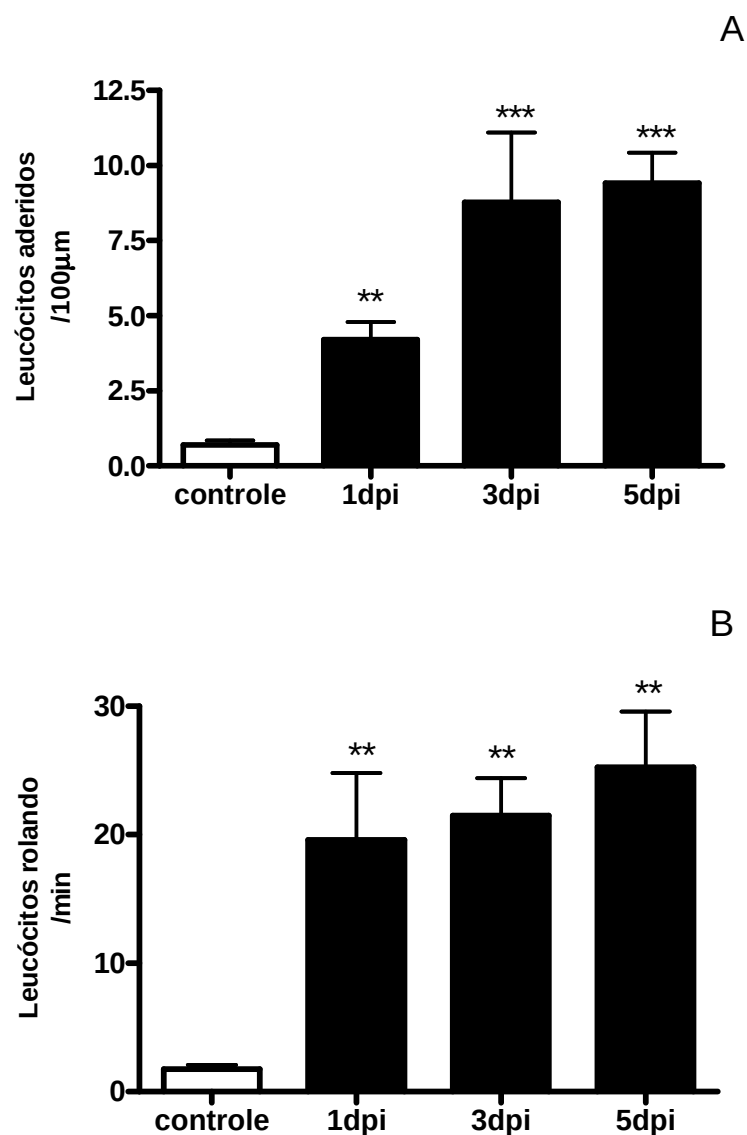


Gráfico 3 Número de leucócitos nas etapas de adesão (A) e rolamento (B) na microcirculação da pia-máter, observado pela técnica de microscopia intravital. Camundongos C57BL/6 ($n = 6$ por grupo) infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana após 1, 3 e 5 dias de infecção. Os dados representam média $\pm$ DP de leucócitos por minuto (rolamento) e leucócitos por 100μm de vaso (adesão). Os valores de leucócitos rolando e aderidos nos vasos da pia-máter de camundongos infectados foram considerados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo controle (** $p < 0,01$). Teste estatístico utilizado: ANOVA com pós -teste de Tukey.

5.1.4 Carga viral

Ao término da microscopia intravital, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Seus cérebros foram retirados e um fragmento foi destinado à quantificação viral. Os homogenatos dos cérebros foram diluídos em placas contendo a cultura de células Vero. Observam-se altos títulos virais nos cérebros dos camundongos infectados com 1 e 3 dias após infecção; e ausência de multiplicação viral nos camundongos controles (Gráfico 4)

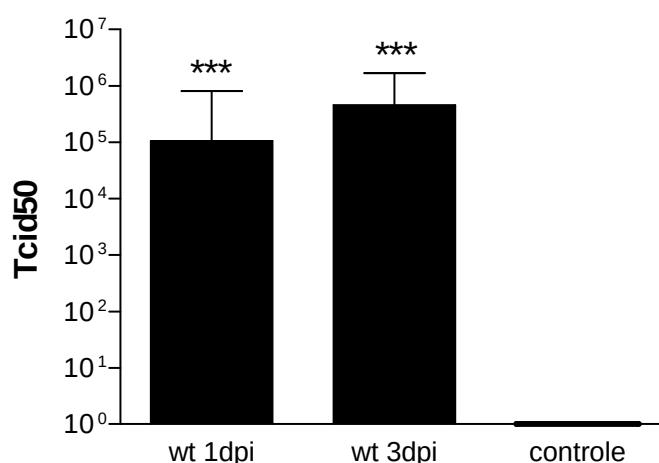


Gráfico 4 Camundongos C57BL/6 (n=6 por grupo) foram infectados por via intracraniana com 10⁴ PFU do vírus HSV-1 ou PBS. Após sacrifício, os cérebros desses camundongos foram coletados e macerados. As células obtidas foram diluídas em cultura de células Vero para titulação, pelo método de Tcid50. Os valores representam média $\pm$ DP. A concentração do vírus no cérebro dos camundongos infectados foi considerada estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo controle (***p<0,001). Foi realizado ANOVA com pós -teste de Tukey.

5.1.5 Produção de quimiocinas e citocina

O próximo passo foi dosar algumas quimiocinas no tecido cerebral com o objetivo de determinar quais destes agentes quimiotáticos estariam envolvidos no recrutamento leucocitário. Para isso, foi retirado um fragmento do cérebro após a realização da microscopia intravital para a dosagem da citocina TNF- α e das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, Kc/CXCL1 e MIG/CXCL9 (gráfico 5).

A quimiocina RANTES/CCL5 apresentou altos níveis em todos os tempos analisados com diferenças significativas nos camundongos infectados em relação aos camundongos que não receberam o vírus HSV-1 (controles).

As quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 e Kc/CXCL1 apresentaram diferenças significativas em relação aos camundongos controles apenas nos dias 1 e 3 após a infecção com o vírus HSV-1.

Os camundongos infectados apresentaram altos níveis da quimiocina MIG/CXCL9 no 1º e 5º dpi, níveis estes estatisticamente significativos em relação aos camundongos que receberam PBS.

A citocina TNF- α atingiu um pico de produção no dia 3º após infecção, sendo o valor significativamente maior que o dos camundongos controles.

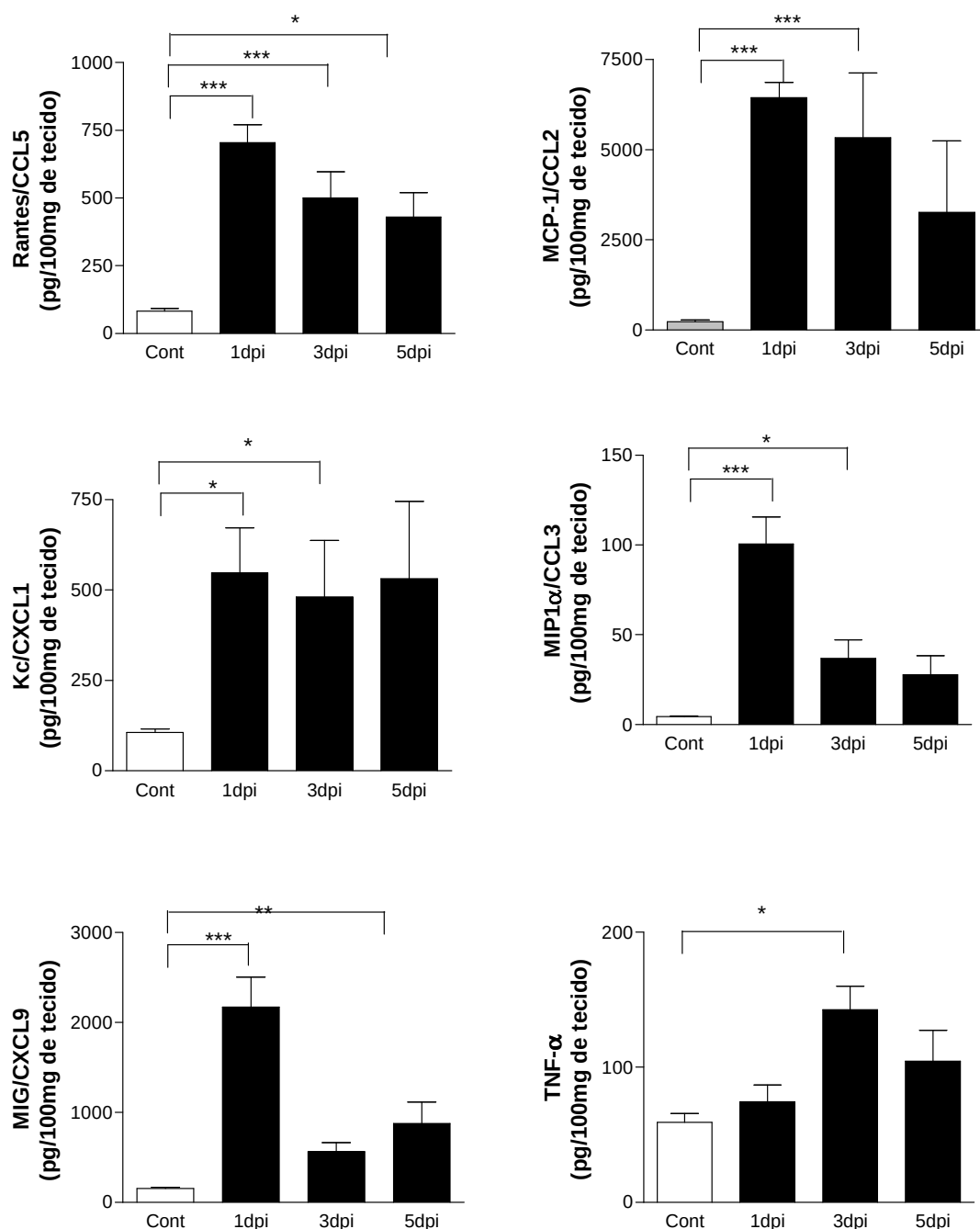


Gráfico 5 Níveis da citocina TNF- α e das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, Kc/CXCL1 e MIG/CXCL9 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 ($n= 8$ por grupo) infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana. Após serem submetidos à técnica de microscopia, os cérebros dos camundongos foram retirados e processados para a dosagem das citocinas pela técnica de ELISA. Os valores representam média $\pm$ DP. Os valores de citocina e quimiocinas produzidas foram considerados estatisticamente significativos (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Foi usado o teste estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.1.6 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue

Após a realização da técnica de microscopia intravital, uma pequena quantidade de sangue foi retirada dos camundongos C57BL/6 infectados e controles para a contagem dos tipos celulares presentes no sangue periférico.

A contagem total de células feita no sangue periférico não apresentou diferenças entre os camundongos C57BL/6 infectados e controles (Gráfico 6).

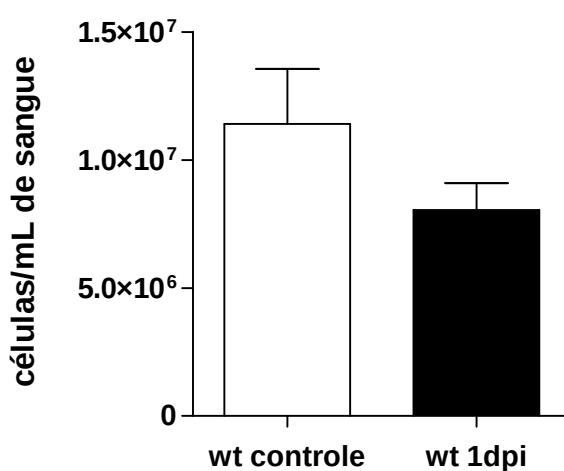


Gráfico 6 Número total de leucócitos no sangue periférico de camundongos controles e C57BL/6 (n=5 por grupo) infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana. A contagem total de leucócitos foi realizada diluindo o sangue em meio Turk. O número de células/mL de sangue não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. Os valores representam média $\pm$ DP.

A contagem de leucócitos no sangue dos camundongos C57BL/6 infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 revelou um aumento significativo de células polimorfonucleares no dia 1 após infecção em relação aos camundongos controles. Em contrapartida, o número de células mononucleares presentes no sangue dos camundongos infectados teve redução significativa em relação aos camundongos controles (Gráfico 7).

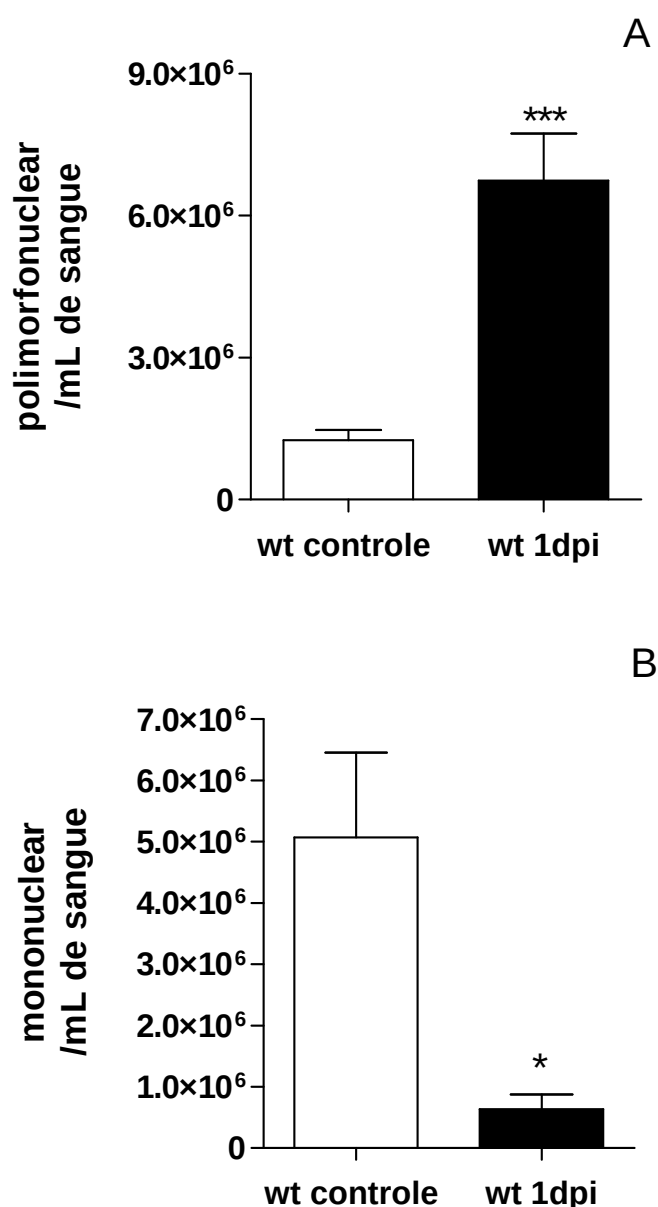


Gráfico 7 Número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares no sangue periférico de camundongos C57BL/6 ($n = 5$ por grupo) infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados com May-Gruwald e Giemsa, o que permitiu a identificação e a quantificação dos diferentes tipos celulares presentes no sangue periférico. Tipos celulares: A) polimorfonuclear e B) mononuclear. O número de células/mL de sangue foi considerado estatisticamente significativo (***) $p < 0,001$, (*) $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Os dados representam média $\pm$ DP. Foi realizado o teste *t-Student*.

5.1.7 Alterações histopatológicas

Utilizando o microscópio óptico, foi realizada a análise histológica no cérebro dos animais infectados com 10^4 PFU e inoculados com PBS. Para isso, camundongos C57BL/6 foram sacrificados após a realização da técnica de microscopia intravital e um fragmento do cérebro foi retirado e submetido aos procedimentos para coloração em HE.

Os cortes histológicos realizados em camundongos C57BL/6 inoculados com PBS não mostraram alterações significativas e/ou patológicas.

A observação por HE de cortes cerebrais de camundongos C57BL/6 infectados mostrou congestão nos vasos e presença de células inflamatórias na meninge, cujo infiltrado era predominantemente de células mononucleares (Ilustração 7, Foto E).

O parênquima cerebral apresentou uma reatividade vascular mais intensa nos camundongos infectados que nos camundongos controles. Os vasos apresentavam leucócitos aprisionados no espaço de “Virchow-Robin”, fenômeno descrito como manguitos perivasculares (Ilustração 7, Fotos B e F). Os processos de encefalite observados ocorreram em focos, predominantemente de células mononucleares (Ilustração 7, Foto 2D e 2C).

Os processos de encefalite progrediram à medida que aumentou o tempo de infecção. Os animais no dia 5 após infecção apresentaram os casos mais graves, com regiões de necrose (Tabela 1). Pode-se também observar reatividade vascular durante todos os dias analisados.

Tabela 1 Análise semi-quantitativa do cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana.

Parâmetros	Alterações degenerativas e necrose	Reatividade perivascular e congestão	Infiltrado de mononuclear na meninge
Grupos			
C57BL/6 1dpi	0 (4/5)	0(1/5)	0(0/5)
	*(1/5)	*(2/5)	*(3/5)
	** (0/5)	**/(2/5)	** (1/5)
	*** (0/5)	*** (0/5)	*** (1/5)
C57BL/6 3dpi	0(5/7)	*(0/7)	*(3/7)
	*(1/7)	** (4/7)	** (2/7)
	** (0/7)	*** (3/7)	*** (2/7)
	*** (1/7)		
C57BL/6 5dpi	0(1/3)	*(0/3)	*(0/3)
	*(0/3)	** (1/3)	** (1/3)
	** (0/3)	*** (2/3)	*** (2/3)
	*** (2/3)		

0= ausência de alterações ; *pouca , **moderada e *** intensa alteração.

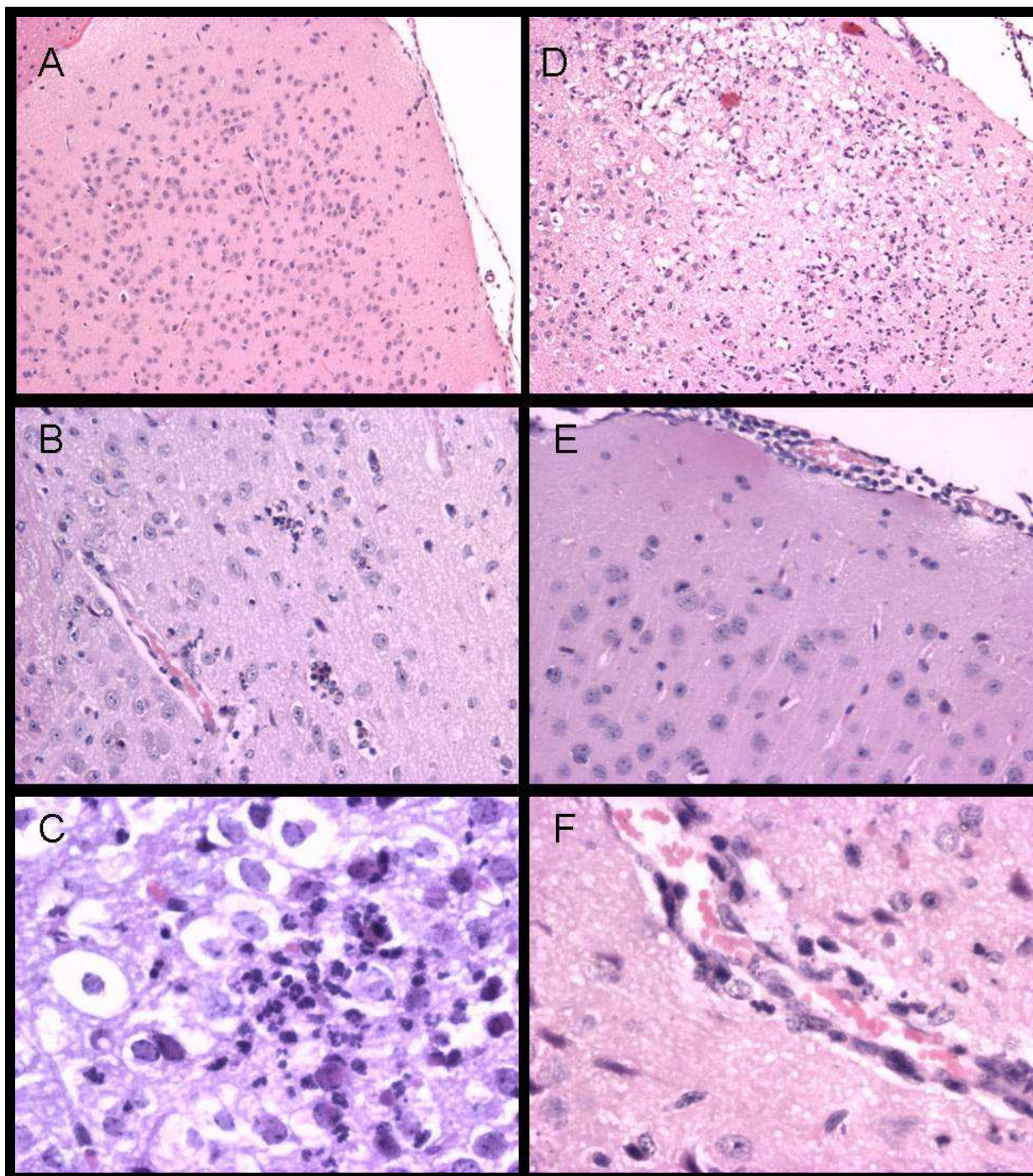


Ilustração 7 Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana . A) Aspecto normal do cérebro de camundongos inoculados com PBS X100; B) Reatividade vascular em camundongo C57BL/6 com 1 dpi. X200; C) Infiltrado de células mononucleares no parênquima cerebral de camundongos C57BL/6 com 3 dpi. X400; D) Foco de encefalite, presença de infiltrado celular e degeneração/necrose com 5dpi X100; E) Infiltrado de células mononucleares na meninge de camundongos C57BL/6 com 1dpi X200; F) Presença de células inflamatórias no espaço perivascular X400; Coloração: Hematoxilina Eosina.

5.2 Resultados referentes aos experimentos realizados com camundongos TNFR1^{-/-}

5.2.1 Mortalidade e sinais clínicos

O próximo passo deste trabalho foi investigar o papel do receptor TNFR1 neste modelo de encefalite. Para isto, camundongos TNFR1^{-/-} foram submetidos à infecção por via intracraniana com 10⁴ PFU do vírus HSV-1. Como os camundongos C57BL/6 (wt) infectados, também os animais TNFR1^{-/-} apresentaram sinais característicos da encefalite como: perda de massa, paresia dos membros e alterações posturais.

Pode-se, então, verificar que camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram 100% de mortalidade com 3 dpi (Gráfico 8). Não houve, contudo, diferença estatística entre os dois grupos experimentais.

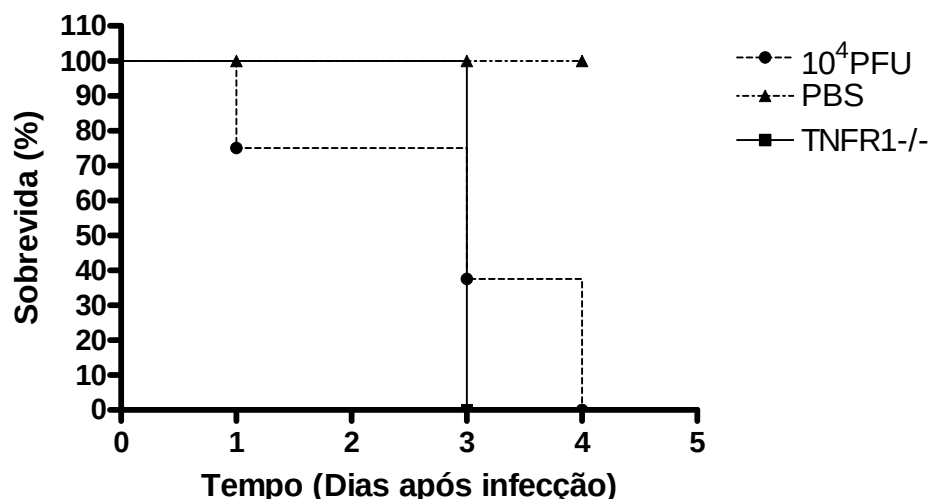


Gráfico 8 Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 ($n=8$) e TNFR1^{-/-} ($n=7$) infectados por via intracraniana com 10⁴ PFU do vírus HSV-1 ou PBS. Os animais foram acompanhados ao longo do tempo (dias). Após a infecção com o vírus HSV-1, os camundongos C57BL/6 e TNFR1^{-/-} apresentaram alta mortalidade. Camundongos controles, inoculados com PBS, apresentaram 100% de sobrevivência durante todo o tempo avaliado. Teste estatístico usado: Kaplan-Meier. $p < 0,05$

5.2.2 Interação leucócito-endotélio

A microscopia intravital revelou que camundongos C57BL/6 infectados apresentaram aumento significativo do número de leucócitos nas etapas de rolamento e adesão em relação aos camundongos controles. O aumento também foi observado ao comparar camundongos TNFR1^{-/-} infectados com camundongos TNFR1^{-/-} controles, sendo este um aumento significativo. Entretanto, quando realizada a comparação entre camundongos C57BL/6 infectados e camundongos TNFR1^{-/-} infectados com 1dpi, não se observaram diferenças significativas (Gráfico 9).

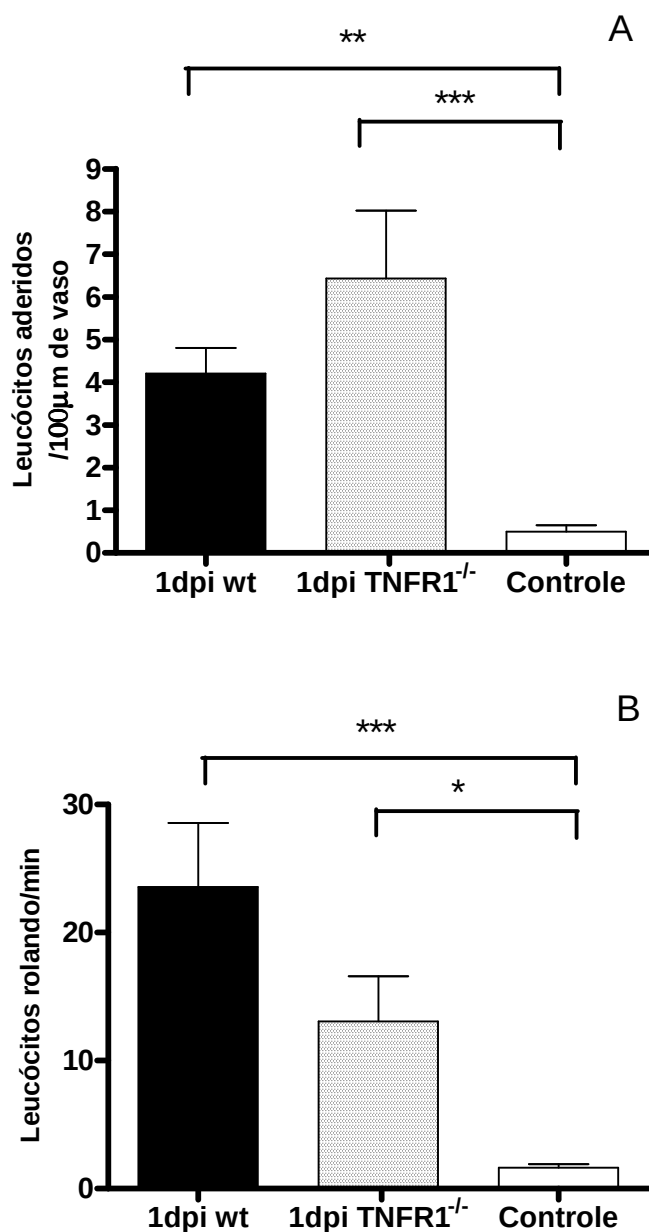


Gráfico 9 Número de leucócitos nas etapas de adesão (A) e rolamento (B) na microcirculação da pia-máter, observado pela técnica de microscopia intravital. Camundongos C57BL/6 (wt) ($n = 7$) e TNFR1^{-/-} ($n = 7$) infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana foram submetidos à técnica de microscopia intravital 1 dia após infecção. Os dados representam média $\pm$ DP de leucócitos por minuto (rolamento) e leucócitos por 100µm de vaso (adesão). Os valores de leucócitos rolando e aderidos nos vasos da pia-máter de camundongos infectados foram considerados estatisticamente significativos (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Testes estatísticos utilizados: ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.2.3 Carga viral

Camundongos $TNFR1^{-/-}$ infectados com 10^4 PFU do vírus HSV-1 foram sacrificados e, em seguida, foram retirados os cérebros para a realização da titulação viral.

Observam-se altos títulos virais no cérebro dos animais $TNFR1^{-/-}$ infectados como já observado nos camundongos C57BL/6 infectados. Porém, não houve diferenças significativas entre os dois grupos experimentais (Gráfico 10).

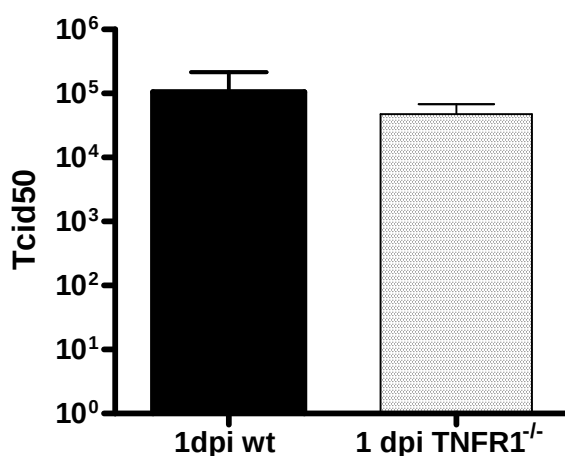


Gráfico 10 Camundongos C57BL/6 (wt) e $TNFR1^{-/-}$ foram infectados por via intracraniana com 10^4 PFU do vírus HSV-1. Após o sacrifício, os cérebros desses camundongos foram coletados e macerados. As células obtidas foram diluídas em cultura de células Vero para titulação, pelo método de Tcid50. Os valores representam média $\pm$ DP. A diferença de concentração do vírus no cérebro dos camundongos $TNFR1^{-/-}$ infectados não foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo wt. Foi realizado o teste *t-Student* entre grupos infectados $TNFR1^{-/-}$ 1dpi e C57BL/6 (wt) 1dpi. O número de animais em cada grupo foi de 7.

5.2.4 Produção de quimiocinas

Foi avaliada a produção das quimiocinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Kc/CXCL1 e MIG/CXCL9 com o objetivo de comparar a síntese destas entre os camundongos TNFR-1^{-/-} infectados com o grupo wt infectados, com 1dpi.

Observou-se aumento da expressão das quimiocinas: MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Kc/CXCL1 e MIG/CXCL9, quando realizada a comparação entre camundongos TNFR1^{-/-} infectados e TNFR-1^{-/-} controles.

Em relação à comparação entre animais wt e TNFR1^{-/-} infectados, pode-se observar uma menor e significativa expressão das quimiocinas MCP-1/CCL2 e MIG/CXCL9 (Gráfico 11).

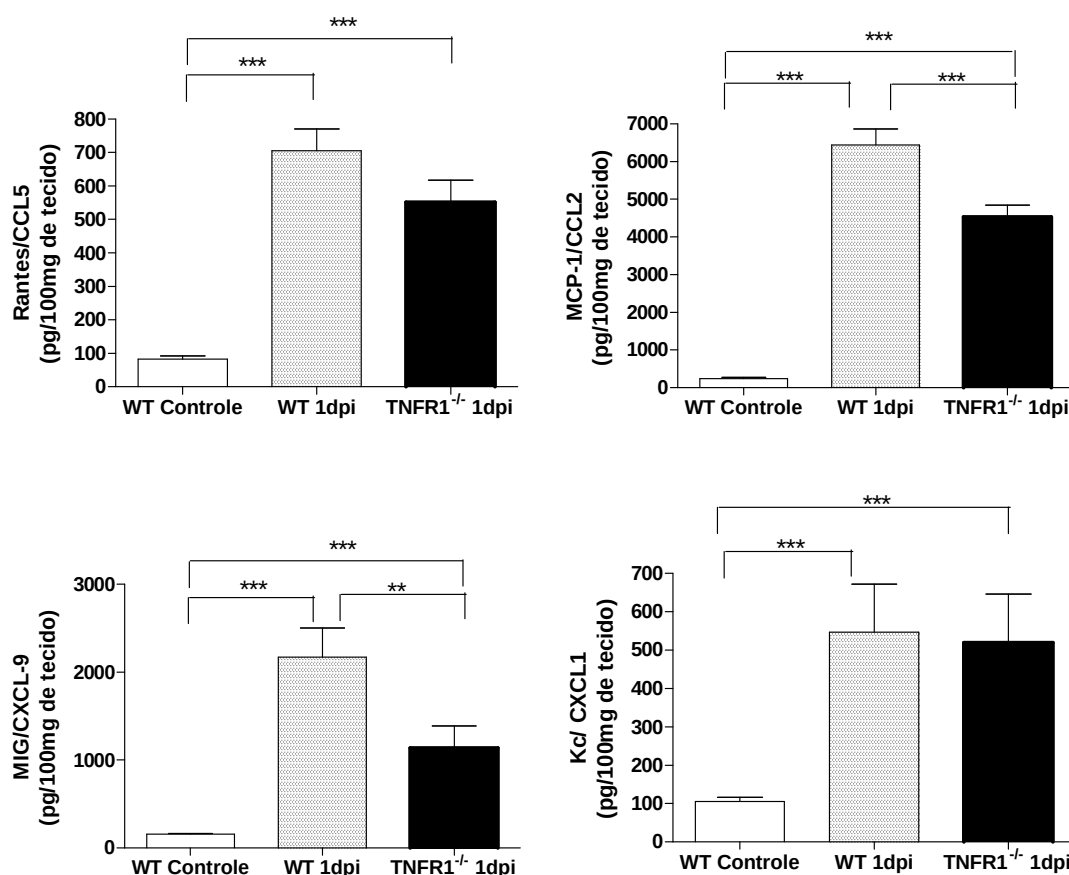


Gráfico 11 Produção das quimiocinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Kc/CXCL8 e MIG/CXCL9 por células cerebrais. Camundongos C57BL/6 e TNFR1^{-/-} infectados com 10⁴ PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana. Após serem submetidos à técnica de microscopia intravital, o cérebro dos camundongos foi retirado e processado para a dosagem com 1 dia após infecção, pela técnica de ELISA. Os valores representam média ± DP. Os valores de quimiocinas produzidas pelos camundongos TNFR1^{-/-} e C57BL/6 foram considerados estatisticamente significativos (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle e quando comparados entre si. Foi usado o teste estatístico ANOVA com pós-teste de Tukey. O número de camundongos de cada grupo foi de 8.

5.2.5 Alterações histopatológicas

A observação histológica por HE de cortes cerebrais de camundongos TNFR1^{-/-} infectados mostrou um característico infiltrado de células mononucleares na meninge, assim como congestão nos vasos (Ilustração 8, Fotos C e D). Os achados na meninge dos camundongos *knock out* foram semelhantes aos achados nos camundongos selvagens (Tabela 2).

Foi encontrada reatividade vascular no parênquima cerebral dos camundongos TNFR1^{-/-} infectados com HSV-1 (Ilustração 8, Foto A e B). Essa reatividade também foi semelhante à encontrada nos camundongos selvagens infectados (Tabela 2).

Tabela 2. Análise semi-quantitativa do cérebro de camundongos C57BL/6 e TNFR1^{-/-} infectados com 10⁴ PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana.

Parâmetros	Alterações degenerativas e necrose	Reatividade perivascular e congestão	Infiltrado de mononuclear na meninge
Grupos			
C57BL/6	0 (4/5)	0 (1/5)	*(3/5)
1dpi	*(1/5)	*(2/5) **/(2/5)	** (1/5) *** (1/5)
TNFR ^{-/-} 1dpi	0 (6/6)	** (2/6) *** (4/6)	** (2/6) *** (4/6)

0= ausência de alterações; *pouca, **moderada e *** intensa alteração.

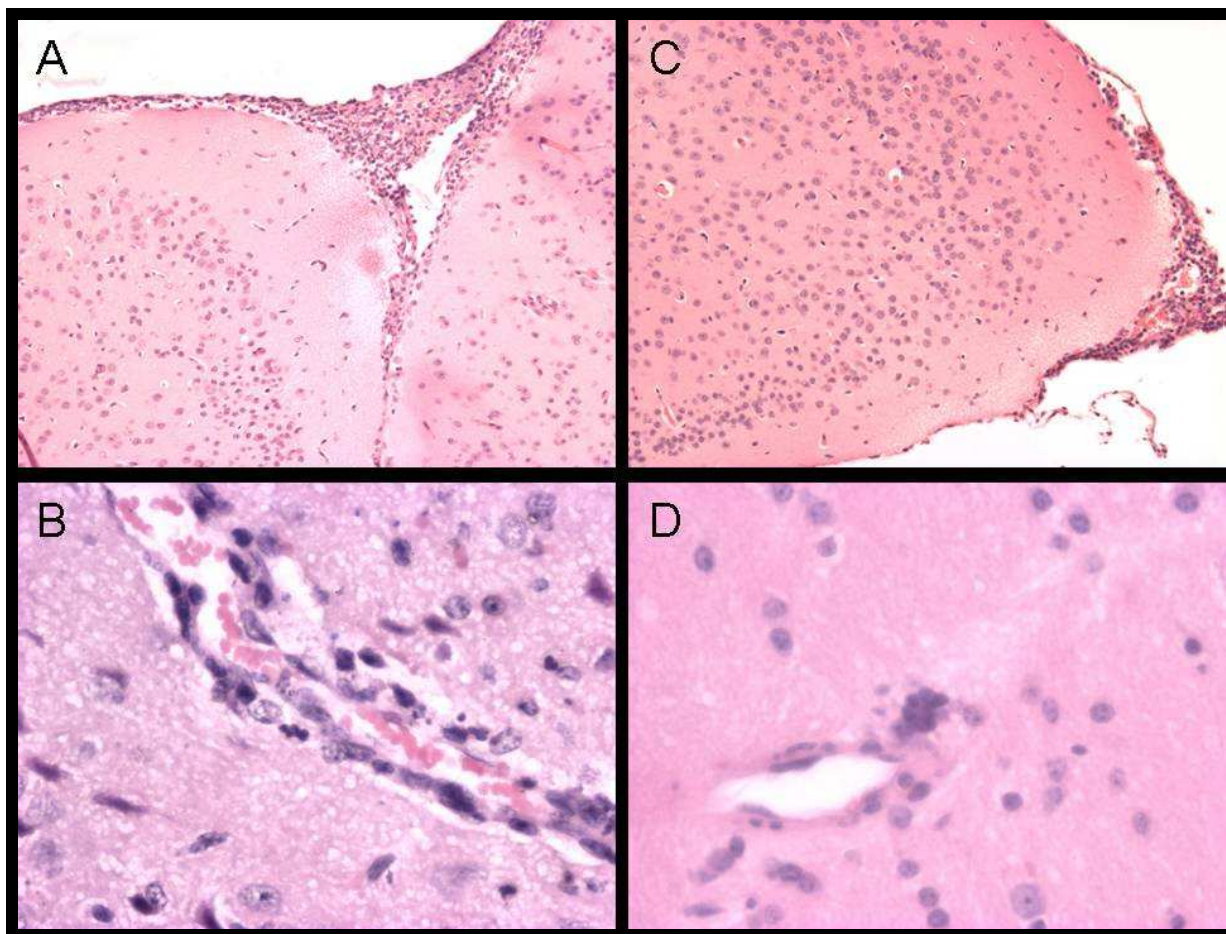


Ilustração 1 Fotomicrografias de cérebro de camundongos C57BL/6 e TNFR1^{-/-} infectados com 10⁴ PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana . A) Infiltrado de células mononucleares na meninge de camundongos C57BL/6 com 1dpiX200; B) Presença de células inflamatórias no espaço perivascular C57BL/6 com 1 dpi, X400; C) Infiltrado de células mononucleares na meninge de camundongos TNFR1^{-/-} com 1dpi, X200; D) Presença de células inflamatórias no espaço perivascular de camundongos TNFR1^{-/-} com 1 dpi, X400. Coloração: Hematoxilina Eosina.

Discussão

6 Discussão

Vários modelos experimentais estão descritos na literatura para o estudo da encefalite pelo herpes vírus. Esses modelos incluem vários sítios de inoculação como: intranasal, ocular e intracerebral, como também diferentes valores de inóculo (Mansur *et al.*, 2005; Lang & Nikolich-Zugich, 2005; Zhou *et al.*, 2003, Glass *et al.*, 2001). O estabelecimento do valor do inóculo de 10^4 PFU escolhido neste trabalho foi mediante a realização de uma curva de sobrevivência em camundongos da linhagem C57BL/6. Esses animais foram submetidos a diferentes inóculos e as curvas de mortalidade encontradas nos grupos das doses 10^2 a 10^4 apresentaram mortalidade similar, embora tenha sido mais homogênea com a dose de 10^4 . Cabe comentar que, neste trabalho, foi empregado o mesmo “pool” de partículas virais do vírus HSV-1 cepa EK. No entanto, em alguns experimentos, parte dos animais sobreviveu até o 6º dpi, permitindo o estudo dos parâmetros inflamatórios no 5º dpi. Não houve diferença estatística entre as curvas que levaram à morte no 4º dpi ou no 6º dpi.

Mansur e colaboradores (2005) inocularam em camundongos C57BL/6 o mesmo vírus utilizado neste trabalho pela via intranasal, mas não foi observado encefalite nestes animais. Esses autores mostraram que apenas os camundongos $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ e $\text{TLR2}^{-/-}$ apresentaram sinais de encefalite. O vírus HSV-1 permaneceu no gânglio trigêmeo tanto dos camundongos selvagens quanto dos camundongos *knock out*. Este resultado mostra que a resposta imune inata elaborada neste órgão tem um papel importante na defesa do hospedeiro contra o vírus HSV-1 (Mansur *et al.*, 2005). Como nosso interesse era estudar o processo inflamatório no SNC determinado pelo HSV, optamos então por inoculá-lo por via intracraniana.

Nosso trabalho mostrou que camundongos C57BL/6 após infecção intracraniana do vírus HSV-1 apresentaram alta taxa de mortalidade, e essas mortes estão intimamente

relacionadas com a multiplicação viral no cérebro dos animais. A titulação do HSV-1 no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 mostrou-se alta, sugerindo que todos os sinais clínicos apresentados pelos animais foram ao nosso achado em decorrência da capacidade neurotrópica e destrutiva do vírus. Conforme o nosso achado, Sellner e colaboradores (2005) e (2006) mostraram que todos os camundongos da linhagem SJL infectados 10^5 PFU do vírus HSV-1 cepa F por via intranasal foram capazes de desenvolver encefalite com evidentes achados clínicos da doença a partir do 2º dia após infecção (Selner *et al.*2005, Selner *et al.*2006).

A significativa perda de massa observada também é um forte indicativo da gravidade da infecção. DeLano & Mallery (1998) observaram perda de peso nos animais C57BL/6 infectados com HSV-1 que desenvolveram encefalite. Quando esses animais com infecção herpética no SNC eram submetidos a uma condição estressante, a perda de peso era ainda maior (DeLano & Mallery, 1998).

Uma vez que, neste trabalho, os camundongos C57BL/6 submetidos à infecção pelo HSV-1 apresentaram várias manifestações clínicas de encefalite, o próximo passo foi avaliar eventos inflamatórios como o processo de recrutamento celular.

Na literatura, existem poucos trabalhos sobre a microcirculação na pia-máter com enfoque na interação leucócito-endotélio pela técnica de microscopia intravital por fluorescência. Esta técnica é uma ferramenta dinâmica que permite o estudo de vários passos que estão envolvidos no processo que leva à transmigração do leucócito. Vale a pena ressaltar que esta técnica permite correlacionar os níveis das interações leucócito-endotélio com a intensidade do processo inflamatório no tecido. A visualização das interações leucócito-endotélio *in vivo* em um vaso inflamado tem revelado que, inicialmente, as células se aproximam do endotélio, em seguida, rolam e depois aderem firmemente à parede do endotélio até que o leucócito alcance o tecido inflamado (Kerfoot & Kubes, 2002).

Neste trabalho, demonstramos que camundongos C57BL/6 quando infectados com o vírus HSV-1 apresentaram um aumento significativo das etapas de rolamento e adesão do leucócito nos vasos da pia-máter em comparação com camundongos controles. Os achados histológicos de infiltrado de leucócitos na meninge, na região do parênquima cerebral e na região perivascular dos vasos são indicativos de que as células inflamatórias transmigraram o endotélio. Uma vez que o cérebro não é um órgão translúcido, a visualização da etapa da transmigração de leucócitos para o parênquima não é possível pela microscopia intravital (Ley, 2001).

A regulação dos mecanismos de entrada do leucócito no SNC ainda não está totalmente elucidada. Estudos mostraram que as quimiocinas estimulam a expressão de moléculas de adesão na superfície de linfócitos no processo de migração para o cérebro (Ransohoff, 2002).

Em associação com os resultados de microscopia intravital foi também encontrado um aumento na produção das quimiocinas MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5 Kc/CXCL1 e MIG/CXCL9 no cérebro de camundongos infectados com HSV-1, sugerindo que as quimiocinas produzidas podem estar envolvidas no processo de recrutamento celular.

A quimiocina RANTES/CCL5 apresentou altos níveis em todos os tempos analisados. Esta quimiocina age sobre o receptor CCR5 e é quimioatraente para monócitos e células T. Nossos resultados mostraram que o número de células mononucleares era muito expressivo nos focos inflamatórios, o que se deve em parte pela alta produção da quimiocina RANTES/CCL5.

Após fazer a infecção com o vírus HSV-1 por escarificação de córnea em camundongos C57BL/6, Carr e colaboradores (2006) detectaram a presença do vírus no cérebro e a produção das quimocinas MCP-1/CCL2, MIP1- α /CCL3 e RANTES/CCL5; além

das citocinas IL-12 e IFN- γ no 7 dpi. Isso mostra que as quimiocinas da família CCL estão envolvidas no processo de infecção do SNC pelo vírus HSV-1 (Carr *et al.*, 2006).

Lokensgard e colaboradores (2002) observaram que o sobrenadante de cultura de células da glia em contato com o vírus HSV-1 produz consideráveis quantidades de RANTES/CCL5 e IP-10/CXCL10, além das citocinas TNF- α e IL-1- β . O tratamento com RANTES/CCL5 em neurônios e astrócitos antes da infecção com o vírus HSV-1 foi incapaz de reduzir os títulos do vírus, mas o tratamento com IP-10/CXCL10 reduziu a multiplicação viral. Esses dados sugerem que algumas quimiocinas também agem diretamente na multiplicação viral (Lokensgard *et al.*, 2002).

Nossos dados também indicaram uma alta produção da quimiocina MCP-1/CCL2 no modelo de encefalite grave pelo vírus HSV-1. Além de um aumento na produção da quimiocina MIG/CXCL9.

Wickham e colaboradores (2005), após infectarem camundongos C57BL/6 com o vírus HSV-1 por escarificação de córnea, observaram o desenvolvimento de encefalite nestes animais. Foi possível detectar a multiplicação do vírus, como também a produção de RANTES/CCL5, MIG/CXCL9 e IP10/CXCL10 no tronco encefálico. O trabalho de Wickham e colaboradores (2005) tinha como objetivo principal estudar o papel das quimiocinas MIG/CXCL9 e IP10/CXCL10. Para isso, foram utilizados camundongos deficientes do receptor CXCR3. Esses animais CXCR3^{-/-} infectados com 500 PFU do vírus HSV-1 por escarificação de córnea apresentaram maior taxa de sobrevivência, mas com elevada multiplicação do vírus no gânglio trigêmeo e cérebro. Em associação ao aumento dos títulos virais nesses animais *knock out* também foi observado um aumento na expressão das quimiocinas RANTES/CCL5 e IP10/CXCL10 e da citocina IFN- γ no tronco encefálico. Esse conjunto de resultados sugere que os camundongos CXCR3^{-/-} permitem a multiplicação do vírus em uma

curta janela de tempo, mas conseguem elaborar uma resposta imune eficiente e, assim, controlam a infecção. (Wickham *et al.*, 2005).

Em humanos, a encefalite provocada pelo HSV-1 envolve uma inflamação aguda e focal, com processo necrótico-hemorrágico predominantemente nos lobos frontal e temporal (Kleinschmidt-DeMaster & Gilden, 2001). Em modelos experimentais de encefalite causada pelo HSV-1 e em casos humanos foram detectadas alterações vasculares com destruição da barreira hematoencefálica, congestão de capilares e petéquias (Arsénio-Nunes *et al.*, 1975).

Como descrito anteriormente, foi detectado infiltrado de células mononucleares e congestão nos vasos da meninge no cérebro de camundongos infectados com HSV-1. No parênquima destes animais, foi observada uma reatividade vascular maior que nos camundongos controles. Próximo aos vasos foi nítido a presença de células inflamatórias, característica descrita como manguitos perivasculares. Os focos inflamatórios no parênquima eram predominantemente de células mononucleares. Pôde-se perceber também destruição de neurônios e ativação das células da glia. A análise do tipo celular realizada no sangue periférico mostrou uma redução de mononucleares, o que sugere provavelmente a migração de células para o tecido cerebral. Na literatura estão descritos os mesmos achados histológicos nos modelos experimentais de encefalite herpética (Sellner *et al.*, 2006; Lundberg *et al.*, 2007).

A resposta imune contra o vírus HSV-1 é muito complexa, mas estudos têm mostrado que IFN α/β , IFN γ e TNF- α são elementos fundamentais na resposta contra o vírus HSV-1 (Vollsted *et al.*, 2004; Minagawa *et al.*, 2004).

Camundongos deficientes para a citocina TNF- α e infectados com HSV-1 por desafio ocular morreram mais que camundongos controles e apresentaram uma alta dos títulos do vírus em órgãos como olho, gânglio trigêmeo e cérebro, sugerindo que a falta da citocina TNF- α promove a reativação do HSV-1 (Minagawa *et al.*, 2004). Ainda, experimento *in vitro*

mostrou que cultura de astrócitos, quando infectada com HSV-2 e tratada com TNF- α , apresentava menor taxa de multiplicação do vírus (Adams *et al.*, 2004). A produção de TNF- α no cérebro dos camundongos C57BL/6 infectados no nosso modelo foi significativa apenas no 3º dpi.

Em outros modelos de inflamação do SNC como, por exemplo, pelo parasito *Toxoplasma gondii*, camundongos TNF^{-/-} apresentaram alta mortalidade e alta carga parasitária no cérebro (Schluter *et al.*, 2003). Yap e colaboradores (1998) mostraram que camundongos deficientes para os receptores 1 e 2 da TNF- α morreram de encefalite necrotizante após serem infectados com *Toxoplasma gondii* (Yap *et al.*, 1998).

Em modelo experimental de malária cerebral, outro modelo de infecção do SNC, camundongos TNFR2^{-/-} sobrevivem mais que camundongos selvagens após infecção com *P. berghei* ANKA, porque é necessário este receptor para o seqüestro do leucócito nos vasos, devido aumento da expressão de ICAM (Stoelcker *et al.*, 2002).

Camundongos TNFR1^{-/-} em modelo de neurite autoimune experimental apresentaram sinais clínicos mais graves e aumento do número de células inflamatórias no SNP (Lu *et al.*, 2007). No modelo de EAE não ocorre um aumento da gravidade da doença em camundongos TNFR1^{-/-} quando comparado a C57BL/6 (Wheeler *et al.*, 2006). Os autores discutem este resultado apoiados na observação do aumento da secreção de IFN- γ pelas células T dos camundongos TNFR1^{-/-} e esta citocina não está correlacionada com a gravidade da doença (Wheeler *et al.*, 2006).

Encefalite também pode ser causada em decorrência da infecção pelo rabidovírus, vírus altamente neurotrópico. Camundongos TNFR1^{-/-} mostraram-se mais resistentes que camundongos C57BL/6 a infecção aguda pelo vírus da raiva (Camelo *et al.*, 2001). Experimentos *in vitro* mostraram que o receptor TNFR1 rapidamente desaparece da superfície de células HeLa após exposição com 10 PFU do vírus HSV (Liang *et al.*, 2006).

Em conjunto, esses estudos mostraram a complexidade dos mecanismos de ação dos receptores da citocina TNF- α . A literatura contém resultados contraditórios sobre o papel dos receptores do TNF- α em modelos de neuroinflamação, justificando assim, o estudo o estudo do receptor TNFR-1 em nosso modelo.

Outro conjunto de dados apresentados no nosso trabalho é referente ao grupo de camundongos TNFR1^{-/-}. Os animais deficientes para o receptor 1 apresentaram taxa de mortalidade e títulos virais semelhantes aos camundongos selvagens. Outro parâmetro avaliado que foi similar aos animais selvagens foram as etapas de rolamento e adesão na microcirculação cerebral. Também não houve diferenças nos achados histológicos. Nossos dados com camundongos TNFR1^{-/-} apresentados aqui corroboram os de Lundberg (2007), em que isoladamente os receptores TNFR1 e TNFR2 são dispensáveis contra a infecção viral herpética. Lundberg e colaboradores (2007) mostraram que camundongos TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} e C57BL/6 quando inoculados por via ocular com o vírus HSV-1 apresentaram curvas de sobrevivência similares. Quando estes autores utilizaram camundongos TNF^{-/-} o quadro de encefalite foi agravado. Outras ferramentas utilizadas, além dos camundongos *knock out* para TNF, foram os tratamentos com sTNFR1, anticorpo anti-TNF- α e siTNF- α . Todas as técnicas empregadas levaram ao mesmo resultado (Lundberg *et al.*, 2007). Embora já esteja bem estabelecido que a citocina TNF produza um efeito protetor contra a encefalite por HSV, ainda permanecem incertos os mecanismos que levam a essa proteção. Ou seja, se ambos os receptores perecem não exercer uma função dentro deste contexto inflamatório do SNC, pode-se inferir que existam outras vias para a ação da citocina TNF- α .

O estudo aprofundado dos mecanismos que envolvem a ativação da citocina TNF- α no modelo de encefalite herpética é uma perspectiva interessante de trabalho utilizando, por exemplo, camundongos TNF^{-/-}, o receptor solúvel desta citocina e até mesmo o tratamento com oTNF- α em camundongos infectados com HSV-1.

Outro resultado apresentado anteriormente que abre perspectivas para futuras investigações diz respeito à alta produção da quimiocina RANTES/CCL5. As ferramentas disponíveis como por exemplo, o tratamentos com o anticorpo anti-RANTES, com o antagonista Met-RANTES e camundongos deficientes para CCR5 podem também ser aplicadas neste modelo de encefalite herpética.

Conclusão

7 Conclusão

- Camundongos C57BL/6 quando infectados por via intracraniana com o vírus HSV-1 desenvolvem um quadro de encefalite grave.
- Algumas quimiocinas das subfamílias CC e CXC participam do processo de encefalite causado pelo HSV-1.
- A alta produção de quimiocinas no SNC dos animais C57BL/6 infectados pode estar diretamente relacionada ao aumento de leucócitos das etapas de rolamento e adesão na microcirculação cerebral.
- O receptor 1 para citocina TNF- α não apresentou relevância neste modelo de encefalite herpética, podendo existir outros mecanismos para ação da citocina TNF- α .

8 Referências Bibliográficas

Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Rüsing D, Däubener W. (2004) Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* **6**:806-12.

Adler MW, Geller EB, Chen X, Rogers TJ. (2006) Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS J.* **7**:865-70

Arsénio-Nunes ML, Cerutti I, Farkas-Bargeton E. (1975) Vascular and neuroglial changes in experimental herpes simplex encephalitis: ultrastructural study. *Acta Neuropathol.* **33**:245-56.

Barnett GH, Ropper AH, Romeo J. (1988) Intracranial pressure and outcome in adult encephalitis. *J Neurosurg.* **68**:585-8.

Bazzoni F, Beutler B. (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* **334**:1717-25.

Biron CA. (1998) Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol.* **10**: 383-90.

Camelo S, Lafage M, Galelli A, Lafon M. (2001) Selective role for the p55 Kd TNF-alpha receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis. *J Neuroimmunol.* **113**:95-108.

Camelo S, Castellanos J, Lafage M, Lafon M. (2001) Rabies virus ocular disease: T-cell-dependent protection is under the control of signaling by the p55 tumor necrosis factor alpha receptor, p55TNFR. *J Virol.* **75**:3427-34.

Carswell, E.A. Old, L. J.; Kassel, R. L. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3666-3670

Carr DJ, Chodosh J, Ash J, Lane TE. (2003) Effect of anti-CXCL10 monoclonal antibody on herpes simplex virus type 1 keratitis and retinal infection *J Virol.* **77**:10037-46

Carr DJ, Ash J, Lane TE, Kuziel WA. (2006) Abnormal immune response of CCR5-deficient mice to ocular infection with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* **87**: 489-499

Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. (2000) A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* **87**:1077-8.

DeLano RM, Mallery SR. (1998) Stress-related modulation of central nervous system immunity in a murine model of herpes simplex encephalitis. *J Neuroimmunol.* **89**:51-58

dos Santos AC, Barsante MM, Arantes RM, Bernard CC, Teixeira MM, Carvalho-Tavares J. (2005) CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. *J Neuroimmunol.* **162**:122-129

Fujii S, Akaike T, Maeda H. (1999) Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology*. **256**: 203-12.

Glass WG, Hickey MJ, Hardison JL, Liu MT, Manning JE, Lane TE. (2004) Antibody targeting of the CC chemokine ligand 5 results in diminished leukocyte infiltration into the central nervous system and reduced neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis *J Immunol*. **172**:4018-4025

Glass WG, Liu MT, Kuziel WA, Lane TE. (2001) Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus. *Virology*. **288**:8-17

Gordon YJ. (1990) Pathogenesis and latency of herpes simplex virus type 1 (HSV-1): an ophthalmologist's view of the eye as a model for the study of the virus-host relationship. *Adv Exp Med Biol*.; **278**:205-209.

Grunfeld, C.; Palladino, M. A. (1990). Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic, and cardiovascular activities. *Adv. Intern. Med*. **35**: 45-72,

Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. (2005) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol*. **25**:25-39

Hehlhans T, Männel DN. (2002) The TNF-TNF receptor system. *Biol Chem*. **383**:1581-5.

Herbein G, O'Brien WA. (2000) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* **223**:241-57.

Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L. (1992) Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol.* **141**:981-8

Jung U, Ley K. (1999) Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol.* **162**:6755-62.

Kuna P, Alam R, Ruta U, Gorski P. (1998) RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils, and lymphocytes in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**:873-879

Kansas GS. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies *Blood.* **88**:3259-87

Kinashi T. (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* **5**:546-59.

Kerfoot SM, Kubes P. (2002) Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **169**:1000-6.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. (2001) The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol.* **11**:440-51.

Kneen R., Solomon T., (2008) Management and outcome of viral encephalitis in Children *Paediatrics and Child Health*, **18**: 7-16

Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW. (2004) Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**:1315-1320.

Lang A., Nikolich-Zugich J., (2005) Development and migration of protective CD8⁺ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection *J. Immunol* **174**: 2919-2925

Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. (1999) Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**:5215-20.

Ley K. *Physiology of Inflammation*. New York: Oxford University Press, 2001.

Liesegang TJ. (2001) Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*. **20**:1-13.

Liang L, Roizman B. (2006) Herpes simplex virus 1 precludes replenishment of the short-lived receptor of tumor necrosis factor alpha by virion host shutoff-dependent degradation of its mRNA. *J Virol*. **80**:7756-77569.

Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC. (1997) RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med*. **185**:1371-80

Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev*. **186**:37-46.

Ley K., Laudanna C., Cybulsky M. I. Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Revs Immunol* **7**: 678-689

Lennete E., Schmidt J.(1979). Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chamydial Infections 5^o edition, p.32-35.

Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. (1996)Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol*. **156**:322-7.

Lokensgard JR, Cheeran MC, Hu S, Gekker G, Peterson PK. (2002) Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J Infect Dis*. **186**: 171-179.

Lu MO, Duan RS, Quezada HC, Chen ZG, Mix E, Jin T, Yang X, Ljunggren HG, Zhu J. (2007) Aggravation of experimental autoimmune neuritis in TNF-alpha receptor 1 deficient mice. *J Neuroimmunol*. **186**:19-26.

Lundberg P, Welander PV, Edwards CK 3rd, van Rooijen N, Cantin E. (2007) Tumor necrosis factor (TNF) protects resistant C57BL/6 mice against herpes simplex virus-induced encephalitis independently of signaling via TNF receptor 1 or 2. *J Virol.* 81:1451-60.

Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RM, Rodrigues SC, Akira S, Gazzinelli RT, Campos MA. (2005) Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. *Am J Pathol.* **166**:1419-26.

McEver RP, Cummings RD. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* **100**: 97-103.

McDermott, M.F. (2001). TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell. Mol. Biol.* **47**: 619-635

Melchjorsen J, Pedersen FS, Mogensen SC, Paludan SR. (2002) Herpes simplex virus selectively induces expression of the CC chemokine RANTES/CCL5 in macrophages through a mechanism dependent on PKR and ICP0. *J Virol.* **76**:2780-2788.

Minagawa H, Hashimoto K, Yanagi Y. (2004) Absence of tumour necrosis factor facilitates primary and recurrent herpes simplex virus-1 infections. *J Gen Virol.* **85**:343-347.

Mole L, Ripich S, Margolis D, Holodniy M. (1997) The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load *J Infect Dis.* **176**: 766-770

Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. **264**:1918-21.

Nakajima H, Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F. (2000) A pathogenic role of Th2 responses on the severity of encephalomyelitis induced in mice by herpes simplex virus type 2 infection. *J Neuroimmunol*. **110**: 106-113

Nakajima H., Kobayashi M., Pollard R.B., Suzuki F. (2001) Monocyte chemoattractant protein-1 enhances HSV-induced encephalomyelitis by stimulating Th2 responses. *J Leukoc Biol*. **70**: 374-80

Olsen A. L., Morrey J. D., Smee D. F., Sidwell R. W. (2007) Correlation between breakdown of the blood–brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice *Antiviral Res* **75**: 104-112

Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z. (2003) The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. **62**:593-604

Petty M A., Lo E. H., (2002) Junctional complexes of the blood–brain barrier: permeability changes in neuroinflammation *Prog Neurobiol* **68**: 311–323

Proudfoot AE. (2006) The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions *Biochem Soc Trans*. **34**:422-426

Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TN. (1996) Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem.* **271**: 2599-603

Raschilas F, Wolff M, Delatour F, Chaffaut C, De Broucker T, Chevret S, Lebon P, Canton P, Rozenberg F. (2002) Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: results of a multicenter study. *Clin Infect Dis.* **35**:254-60.

Ransohoff RM. (2002) The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis.* **186**: 152-156.

Ransohoff R.M., Kivisakk P., Kidd G. (2003). Three or more routes for leukocytes migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol* **3**: 569-581.

Rempel JD, Quina LA, Blakely-Gonzales PK, Buchmeier MJ, Gruol DL. (2005) Viral induction of central nervous system innate immune responses. *J Virol.* **79**:4369-81

Roizman B., Sears A.E. (1996). Herpes Simplex viruses an their replication In: Fields, B.N.;Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Ed.) *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 2231-2295.

Roizman B. (1996) The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:11307-11312.

Schlüter D, Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Hoffmann S, Körner H, Deckert M. (2003) Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J Immunol.* **170**:6172-6182.

Schmutzhard E. (2001) Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J Neurol.* **248**:469-77.

Sellner J., Dvorak F., Zhou Y., Haas J., Kehm R., Wildemann B., Meyding-Lamadè U.(2005). Acute and long-term alteration of chemokine mRNA expression after anti-viral and anti-inflammatory treatment in herpes simplex virus encephalitis. *Neurosc. Lett.* **374**: 197-202.

Sellner J, Simon F, Meyding-Lamade U, Leib SL. (2006) Herpes-simplex virus encephalitis is characterized by an early MMP-9 increase and collagen type IV degradation. *Brain Res.* **1125**:155-62.

Shukla D, Spear PG. (2001) Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest.* **108**: 503-510.

Springer TA. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* **57**:827-72.

Stoelcker B, Hehlhans T, Weigl K, Bluethmann H, Grau GE, Männel DN. (2002) Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun.* **70**:5857-5859.

Stumpf TH, Case R, Shimeld C, Easty DL, Hill TJ. (2002) Primary herpes simplex virus type 1 infection of the eye triggers similar immune responses in the cornea and the skin of the eyelids. *J Gen Virol.* **83**:1579-90

Tumpey TM, Fenton R, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. (2002) Role for macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), MIP-1alpha, and interleukin-1alpha in the delayed-type hypersensitivity response to viral antigen. *J Virol.* **76**: 8050-8057.

Tan S. T., Katze M. G., (2000) HSV.com: maneuvering the internetworks of viral neuropathogenesis and evasion of the host defense *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:5684-5686

Umene K, Sakaoka H. (1999) Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch Virol.* **144**: 637-56

Vollstedt S, Arnold S, Schwerdel C, Franchini M, Alber G, Di Santo JP, Ackermann M, Suter M. (2004) Interplay between alpha/beta and gamma interferons with B, T, and natural killer cells in the defense against herpes simplex virus type 1. *J Virol.* **78**:3846-50.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.*; **17**:331-67.

Wickham S, Lu B, Ash J, Carr DJ. (2005) Chemokine receptor deficiency is associated with increased chemokine expression in the peripheral and central nervous systems and increased resistance to herpetic encephalitis. *J Neuroimmunol.* **162**:51-9

Wheeler RD, Zehntner SP, Kelly LM, Bourbonnière L, Owens T. (2006) Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. **118**:527-38.

Whitley RJ, Roizman B. (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet*. **357**:1513-8.

Whitley R J. (2006).Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res* **71**:141-148

Weir JP. (2001) Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene*. **271**:117-130.

Wickham S, Lu B, Ash J, Carr DJ. (2005) Chemokine receptor deficiency is associated with increased chemokine expression in the peripheral and central nervous systems and increased resistance to herpetic encephalitis. *J Neuroimmunol*. **162**:51-9

Willians T W, Granger G A, (1968).Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature*, **219**: 1076-7

Zhou J, Stohlman SA, Hinton DR, Marten NW. (2003) Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J Immunol*. **170**: 3331-6

Yap GS, Scharton-Kersten T, Charest H, Sher A. (1998) Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J Immunol*. **160**:1340-1345.