

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado

**MODULAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE SOBRE
RESPOSTAS NEUROINFLAMATÓRIAS EM MODELO ANIMAL
DE ENCEFALITE CAUSADA PELO VÍRUS *HERPES SIMPLEX*
TIPO 1**

Viviane Mitsuko Neves Saito

Belo Horizonte
2011

Viviane Mitsuko Neves Saito

**MODULAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE SOBRE
RESPOSTAS NEUROINFLAMATÓRIAS EM MODELO ANIMAL
DE ENCEFALITE CAUSADA PELO VÍRUS *HERPES SIMPLEX*
TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Área de concentração: Neurociência
Básica

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo
Moreira
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Lúcio
Teixeira Júnior
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2011

Saito, Viviane Mitsuko Neves
Modulação do sistema endocanabinoide sobre respostas
neuroinflamatórias em modelo animal de encefalite causada pelo
vírus Herpes simplex tipo 1. [manuscrito] / Viviane Mitsuko Neves
Saito. – 2011
56f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Fabrício de Araújo Moreira. Co-orientador: Antônio
Lúcio Teixeira Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Instituto de Ciências Biológicas.

1. Sistema nervoso - Inflamação – Teses. 2. Canabinóides - Teses.
3. Neurociências – Teses. 4. Encefalite por herpes simples. 5. Sintomas
comportamentais. 6. Herpesvirus humano 1. I. Moreira, Fabrício de
Araújo. II. Teixeira Júnior, Antônio Lúcio. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616.831-002

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Imunofarmacologia e no Laboratório de Neurofarmacologia, sob orientação do prof. Antonio Lucio Teixeira Junior, com apoio financeiro parcial da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedico este trabalho a meus pais.

*“Trabalha, como se tudo dependesse de ti,
e confia, como se tudo dependesse de Deus.”*

Santo Inácio de Loyola

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a meus pais, Takanori Saito e Maria Eva Neves Saito, pelo sopro de Vida constante e pelo incentivo a almejar sempre mais do que os olhos conseguem ver. A conquista desse grau acadêmico não teria sido possível sem seu apoio emocional e financeiro. Ao meu irmão Yves, futuro biólogo, com desejo de sucesso em sua vida profissional.

Aos orientadores Prof. Fabrício Moreira, pela disponibilização da droga utilizada neste trabalho e pelos conhecimentos sobre o sistema endocanabinoide, e Prof. Antonio Lucio Teixeira Junior, que aceitou o desafio de me orientar em um projeto audacioso em um curtíssimo período de tempo, agradeço por todos os ensinamentos e por resgatar minha motivação.

A Suzan Such & Fernando Ribeiro, meus padrinhos de mestrado, que me acolheram em sua casa com todo carinho quando eu ainda me instalava em Belo Horizonte. Sempre com hospitalidade, zelo, paciência! Obrigada pela amizade sincera!

À Conceição Baumgart & família, pelo carinho imensurável, incentivo e amizade.

À Prof^a Milene Rachid, aos colaboradores Graciela Kunrath, Luciene Vieira e Nancy Binda, e aos companheiros de laboratório David Rodrigues, Márcia Vilela, Aline Miranda, Roberta Dayrell, Ana Flávia Assis, Larissa Fonseca e Norinne Lacerda-Queiroz, pela amável convivência e por todo aporte teórico e técnico para a realização dos experimentos, sem o qual esta dissertação teria sido verdadeiramente impossível.

A Raphael Gomes Ferreira, por todo amor, companheirismo e força ao longo do caminho que estamos trilhando juntos. Muito obrigada por sempre acreditar no meu potencial, por me incentivar a alçar voos ainda mais altos e por ser esta pessoa que eu admiro tanto. Agradeço também à família Gomes por me receber com tanto carinho.

Aos amigos conquistados durante o mestrado: Pedro Gobira, Lindisley Gomides Luiza Amorim, Natália Rocha, Clarissa Paz, Isabella Bernardes, Luciano Vilela, Ana Flávia Almeida, Pedro Chagas, Fábio Vigil, Polliana Nunes, Ana Raquel Caixeta, Igor Sette, Gabriel Perfeito, Webster Pimenta, Fátima Brant, Wellington Borges ---- Agradeço a todos as palavras de incentivo, os momentos de lazer e boas risadas; pelas críticas, colaborações e discussões científicas. Aos amigos Rafael Rezende, Roberta Dayrell e David Rodrigues, muito obrigada por revisarem o manuscrito deste trabalho!

Ao prof. L.C. Schenberg, pelo exemplo de pesquisador e por me abrir as portas de seu laboratório na UFES para que executássemos experimentos em paralelo ao mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências, pela oportunidade e pelas grandes lições no âmbito profissional e pessoal. Ao pessoal da secretaria do PPG em Neurociências: Fabiana, D. Nely, Heide, Carlos Magno e Vanessa, pela paciência e presteza em atender minhas solicitações.

Aos professores, alunos e funcionários do PPG em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Farmacologia e Laboratório da Dor e da Inflamação. Prof^a Daniela Bonaventura, Prof. André Klein, Prof. Igor Dutra, Sr. Carlos Pacheco, muito obrigada pela cordialidade!

Aos professores Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira e Danielle da Glória de Souza, que compõem a banca examinadora deste trabalho, pela gentileza em aceitarem participar de mais esta etapa de aprendizado em minha vida.

Aos técnicos dos laboratórios e biotérios, em especial Dora, Elmo, Gilmar, Rinaldo, e Wellington – valeu, gente!

Aos animais experimentais (“peludinhos”) que sacrificaram suas vidas em prol da ciência dos homens: o meu respeito, admiração e sincero agradecimento.

RESUMO

O vírus Herpes simplex do tipo 1 (HSV-1) é conhecido por causar lesões cutâneas recorrentes, estabelecendo um estado de latência entre as manifestações, porém a mais grave consequência da infecção por HSV-1 é a encefalite (HSE), que pode acometer pacientes imunocomprometidos e neonatos. Uma vez que a infecção atinge o tecido cerebral, diversos mecanismos inflamatórios são elaborados em resposta ao vírus. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel modulador do agonista canabinoide WIN55,212-2 no desenvolvimento de respostas inflamatórias e comportamentais em animais portadores de HSE. Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade entre 8 e 12 semanas. Estes animais foram inoculados intracranialmente com 10^2 unidades formadoras de placa (PFU) de vírus HSV-1, enquanto que o grupo controle não infectado recebeu apenas PBS pela mesma via. Os camundongos também foram tratados com WIN55,212-2 (1 mg/kg) ou veículo pela via intraperitoneal (i.p), sendo que o tratamento teve início no dia anterior à infecção e continuou até a eutanásia. Na primeira etapa do projeto, foram utilizados camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) e infectados tratados (HSV+WIN) para construir uma curva de letalidade e para avaliar por meio da bateria SHIRPA o aparecimento de sinais clínicos durante 10 dias após a infecção (10 dpi). Na segunda etapa foram obtidos dados acerca dos níveis cerebrais de citocinas e análise histopatológica do hipocampo, referentes ao 4º dpi. Para isso foram utilizados quatro grupos experimentais (camundongos não infectados não tratados - CTRL+VEH; camundongos não infectados tratados - CTRL+WIN; camundongos infectados não tratados - HSV+VEH, e camundongos infectados tratados - HSV+WIN). Na última etapa do trabalho, três grupos tiveram seu desempenho comparado (CTRL+VEH, HSV+VEH e HSV+WIN) em modelos animais preditivos de comportamento. Foram avaliadas alterações comportamentais específicas de memória e ansiedade nos modelos animais de Esquiva Inibitória, Labirinto em Cruz Elevado e Teste de Reconhecimento Social, realizados entre os dias 1 e 2 dpi. Os animais desta etapa foram eutanasiados no 3º dpi para a análise microscópica da morte neuronal no hipocampo. Surpreendentemente, os resultados indicam que sinais clínicos

como perda acentuada de massa corporal, alterações nos reflexos, na função sensorial e rebaixamento no estado neuropsiquiátrico aparecem primeiro em camundongos HSV+WIN e só depois nos animais HSV+VEH. A sobrevivência dos camundongos HSV+WIN também foi menor (100% de mortalidade no 6º dpi) em comparação ao grupo HSV+VEH (100% de mortalidade em 10 dpi). A memória social de curto prazo também estava prejudicada em camundongos HSV+WIN enquanto que camundongos HSV+VEH apresentaram apenas prejuízos leves. Contudo, não houve diferenças entre grupos quanto à aquisição, consolidação e recuperação de memória aversiva no teste da Esquiva Inibitória. No LCE, camundongos HSV+VEH exibiram menor índice de comportamento do tipo ansioso que os animais HSV+WIN. Os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α se mostraram elevados em camundongos infectados, independente do tratamento. A morte neuronal no hipocampo e os dados da análise histopatológica também não apresentaram diferença significativa entre os grupos HSV+VEH e HSV+WIN. Dessa forma conclui-se que o tratamento com o agonista canabinoide WIN55,212-2 exerceu efeito deletério sobre o curso da HSE em camundongos da linhagem C57BL/6, acelerando a mortalidade e promovendo sintomas mais proeminentes da doença, embora não tenha influenciado diretamente os níveis de citocinas nem a perda celular e tecidual no cérebro dos animais.

Palavras-chave: Herpes simplex, Encefalite herpética, Inflamação, Comportamento, Canabinoides.

ABSTRACT

The *Herpes simplex virus* type 1 (HSV-1) is a pathogen known to cause recurrent skin lesions and to establish a latent state between manifestations. However, the most serious consequence of HSV-1 infection is herpes encephalitis (HSE), affecting mainly immunocompromised patients and neonates. Once the infection reaches the cerebral tissue, several inflammatory mechanisms are triggered to defend the host against the virus. The aim of this research was to investigate the modulatory role of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 on the development of inflammatory and behavioral changes in mice with HSE. Male C57BL/6 mice, aged 8 to 12 weeks, were used in this study. These animals were intracranially inoculated with 10^2 plaque forming units (PFU) of HSV-1, while the uninfected control group received only PBS by the same route. Mice were also treated with WIN55,212-2 (1 mg/kg) or vehicle intraperitoneally (i.p), and the treatment started the day before infection and continued until euthanasia. In the first stage of the project, we used untreated infected mice (HSV+VEH) and treated infected mice (HSV + WIN) to build a lethality curve and to assess the onset of clinical signs, for 10 days post infection (10 dpi) using the SHIRPA battery. Thereafter, another data set was obtained on the 4 dpi, regarding the brain levels of cytokines and histopathology of the hippocampus. For this we used four experimental groups (uninfected untreated mice - CTRL + VEH; uninfected treated mice - CTRL + WIN; untreated infected mice - HSV + VEH, and infected treated mice - HSV + WIN). At last, we assessed specific behavioral changes in animal models of anxiety and memory, *i.e.*, Inhibitory Avoidance paradigm, the Elevated Plus Maze and Social Recognition Test, all held between 1 and 2 dpi. Three groups had their results compared (CTRL+VEH, HSV+VEH and HSV+WIN). Animals from this experiment were euthanized on 3 dpi for microscopic analysis of neuronal loss in the hippocampus. Surprisingly, the results indicate that clinical signs (such as marked loss of body weight, changes in reflexes, sensory function and lowering in the neuropsychiatric status) first appeared in HSV+WIN mice and then in HSV+VEH animals. The survival rate of HSV+WIN mice was also lower (100% mortality on 6 dpi) compared to HSV+VEH group (100% mortality on 10 dpi).

Short-term social memory was also impaired in HSV+WIN mice, whereas HSV+VEH mice showed only mild damage. However, no differences were found between groups concerning the acquisition, consolidation and retrieval of aversive memory in the Inhibitory Avoidance paradigm. In the EPM, HSV+VEH mice exhibited lower rates of anxiety-like behavior than HSV+WIN animals. The levels of IL-1 β and TNF- α were increased in infected mice, regardless of treatment. Data from histopathological analysis and quantification of neuronal death in the hippocampus also did not differ significantly between HSV+VEH and HSV+WIN groups. Therefore, it is concluded that treatment with the cannabinoid agonist WIN55,212-2 had a deleterious effect on the course of HSE in C57BL/6 mice, accelerating mortality and promoting more prominent symptoms of the disease, although it did not directly influence the levels of cytokines or cellular/tissue loss in mice brain.

Keywords: Herpes simplex, Herpetic encephalitis, Inflammation, Behavior, Cannabinoids.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Morfologia do vírus Herpes simplex tipo 1	4
Figura 2. Vírions HSV dentro do núcleo de uma célula infectada.....	5
Figura 3. Fotografia do aparelho utilizado no Teste da Esquiva Inibitória.....	19
Figura 4. Imagem registrada durante o Teste de Reconhecimento Social.....	21
Figura 5. Esquema do protocolo utilizado para o Teste de Reconhecimento Social.....	21
Figura 6. Desenho experimental representando as etapas da pesquisa.....	27
Figura 7. Curva de sobrevivência de camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) versus camundongos infectados tratados (HSV+WIN).....	28
Figura 8. Perda de massa ponderal mensurada no grupo de camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) em comparação ao grupo de camundongos infectados tratados (HSV+WIN)	29
Figura 9. Comparação dos resultados obtidos na categoria Reflexo e função sensorial da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH).....	30
Figura 10. Comparação dos resultados obtidos na categoria Estado Neuropsiquiátrico da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH).....	31
Figura 11. Comparação dos resultados obtidos na categoria Comportamento motor da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH).....	31
Figura 12. Comparação dos resultados obtidos na categoria Função autônoma da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH).....	32
Figura 13. Comparação dos resultados obtidos na categoria Tônus muscular e força da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH).....	32
Figura 14. Avaliação do comportamento tipo ansioso exibido no Labirinto em Cruz Elevado por camundongos controles não infectado não tratados (CTRL+VEH), infectados tratados (HSV+WIN) e infectados não tratados (HSV+VEH).....	33

Figura 15. Avaliação da memória de reconhecimento social em camundongos controles não infectados/não tratados (CTRL+VEH), camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) e camundongos infectados tratados (HSV+WIN).....	34
Figura 16. Resultados obtidos por camundongos controles não infectados/não tratados CTRL+VEH, camundongos infectados não tratados HSV+VEH e camundongos infectados tratados HSV+WIN no Teste de Esquiva Inibitória.....	35
Figura 17. Resultado da dosagem de citocinas no sobrenadante de homogenatos de cérebros de camundongos controles não infectados não tratados (CTRL+VEH), camundongos não infectados tratados com WIN55,212-2 (CTRL+WIN), camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) e animais infectados tratados com WIN55,212-2 (HSV+WIN).....	36
Figura 18. Quantificação da morte celular no hipocampo de camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) versus camundongos infectados tratados (HSV+WIN), em relação ao grupo controle (CTRL+VEH).....	37
Figura 19. Análise histopatológica de diferentes áreas cerebrais de camundongo infectados não tratados (HSV+VEH) em comparação ao grupo de camundongos infectados tratados com canabinoide (HSV+WIN).....	38
Figura 20. Fotomicrografias do encéfalo de camundongos C57BL/6 infectados com 102 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana, 4 dias após a infecção.....	39
Quadro 1. Principais canabinoides.	8
Quadro 2. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.....	17
Quadro 3. Parâmetros constituintes de cada uma dos cinco categorias funcionais utilizadas na interpretação dos resultados do SHIRPA...	18

LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitros
μm	Micrômetro
2-AG	2-araquidonoil-glicerol
AEA	Araquidonoiletanolamida (anandamida)
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina de soro bovino
Ca²⁺	Íon cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CB₁	Receptor canabinoide tipo 1
CB₂	Receptor canabinoide tipo 2
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
dpi	Dia(s) pós infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imuno-sorvente por enzima ligada (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
FAAH	Amida hidrolase de ácidos graxos (<i>Fatty acid amide hydrolase</i>)
g	Gramas
G	Gauge
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
h	Horas
HSE	Encefalite causada por vírus Herpes Simplex tipo 1
HSV-1	Vírus Herpes Simplex tipo 1
i.p.	Intraperitoneal
IFN-γ	Interferon gama

IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilogramas
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LCEA	Líquido cérebro espinhal artificial
M	Molar
mA	Miliampéres
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
n	Número de animais utilizados em cada grupo experimental
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
°C	Graus Celsius
OPD	O-fenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada por fosfato
PFU	Unidade Formadora de Placas
pg	Picogramas
pH	Potencial hidrogeniônico

rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SHIRPA	SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit, Imperial College School of Medicine at St. Mary's, Royal Hospital London, St. Bartholomew's and the Royal London School of Medicine, Phenotype Assessment
SNC	Sistema Nervoso Central
SRT	Teste de Reconhecimento Social (<i>Social Recognition Test</i>)
Th	Células T auxiliares (<i>T Helper</i>)
THC	Δ -9-Tetrahydrocannabinol
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UI	Unidade internacional
VEH	Veículo
VSV	Vírus da estomatite vesicular
WIN55,212-2 (WIN)	(R)-(+)-WIN 55,212-2 sal mesilato

Devido ao uso consagrado na literatura técnica, alguns acrônimos e siglas seguem as iniciais de sua grafia em inglês.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	2
1.2 ENCEFALITE CAUSADA PELO VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1.....	3
1.3 ESTUDO DA ENCEFALITE HERPÉTICA POR MEIO DE MODELOS ANIMAIS	6
1.4 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE	7
1.5 MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CENTRAL POR DROGAS CANABINOIDES	11
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	16
4.2 TRATAMENTO	16
4.3 INDUÇÃO DA ENCEFALITE HERPÉTICA	17
4.4 BATERIA SHIRPA.....	17
4.5 MODELOS ANIMAIS PREDITIVOS DE COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E DE MEMÓRIA.....	19
a) <i>Teste de Esquiva Inibitória (Step Down Inhibitory Avoidance Test)</i>	19
b) <i>Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze)</i>	20
c) <i>Teste de Reconhecimento Social (Social Recognition Test - SRT)</i>	20
4.6 EUTANÁSIA	22
4.7 PREPARO DE HOMOGENATO DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO	22
4.8 ENSAIO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS.....	22
4.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE NEURONAL.....	23
4.10 OBTENÇÃO DE IMAGENS NO MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA ACOPLADO AO SISTEMA APOTOME	24
4.11 QUANTIFICAÇÃO DAS IMAGENS OBTIDAS NO MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA ACOPLADO AO SISTEMA APOTOME.....	24
4.12 HISTOLOGIA.....	25
4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	26
4.14 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
5. RESULTADOS.....	28
5.1 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	28
5.2 SINAIS CLÍNICOS DA ENCEFALITE HERPÉTICA	29
5.3 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS ESPECÍFICAS.....	33
5.4 DOSAGEM DAS CITOCINAS IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ	36
5.5 MORTE NEURONAL NO HIPOCAMPO	37
5.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	54
ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UFMG (CETEA).....	55
ANEXO II - ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da inflamação no Sistema Nervoso Central

O sistema imunológico em mamíferos é essencial para a manutenção da vida e na defesa contra diversos insultos e estímulos nocivos que ameaçam a homeostase. A inflamação, que é resultante do processo de defesa do organismo contra patógenos, envolve o recrutamento de células do sistema imune ao local da infecção, que agem para controlar a propagação de microorganismos e promover recuperação. Didaticamente, é possível reconhecer dois tipos integrados de resposta imune contra um insulto: a resposta inata e a resposta adaptativa (Rang *et al.*, 2001). O processo inflamatório compreende a ação inicial (resposta inata) de células inespecíficas (neutrófilos, eosinófilos, células *natural killer*, macrófagos) com consequente produção de citocinas, ativação de sistemas plasmáticos e liberação de outros mediadores, seguida de etapas especializadas voltadas contra o patógeno (resposta adaptativa), como o recrutamento de linfócitos T, ativação de linfócitos B e produção de anticorpos (Rang *et al.*, 2001).

Diferente do que ocorre em órgãos sistêmicos, o cérebro não depende exclusivamente da resposta adaptativa ou da infiltração de fagócitos para reconhecer e eliminar patógenos; ao invés disso, a resposta imune inata no sistema nervoso central (SNC) baseia-se na ativação de células gliais residentes, isto é, células dendríticas, astrócitos, microglia e células ependimais (Hauwel *et al.*, 2005) existindo pouca infiltração de neutrófilos e monócitos (Rang *et al.*, 2001). A inflamação no SNC envolve múltiplas e complexas respostas celulares que incluem a ativação da microglia e astrócitos, que levam a produção de mediadores inflamatórios como Interferon gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α), Interleucina 1 Beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), eicosanoides, radicais livres e óxido nítrico (NO), ativação do complemento e liberação de proteínas de fase aguda (Benito *et al.*, 2008). Todo esse processo pode prosseguir com o influxo de monócitos e linfócitos do sangue, produção de mais substâncias inflamatórias, proporcionando a

fagocitose de patógenos e de debris neuronais (Cabral & Marciano-Cabral, 2005; Benito *et al.*, 2008; Loane & Byrnes, 2010).

Na maior parte dos casos, uma resposta inflamatória rápida e robusta - associada à produção de citocinas pró-inflamatórias e à capacidade dos linfócitos T em eliminar células infectadas - são essenciais para a resolução da inflamação e para determinar as chances de sobrevivência do hospedeiro (Reiss, 2010). Por outro lado, uma exacerbação da reação inflamatória no SNC pode causar danos aos neurônios por estresse oxidativo e pela excreção de compostos neurotóxicos (Hauwel *et al.*, 2005; Reiss, 2010). Sendo assim, faz-se necessário o equilíbrio do processo inflamatório para que o organismo consiga responder de forma eficiente e controlada ao insulto.

O sistema imunológico e o SNC mantém uma estreita relação bidirecional. O SNC influencia a imunidade pela liberação de neurotransmissores, neuropeptídeos e fatores neurotróficos que regulam a função de diversas células do sistema imune (Jean-Gilles *et al.*, 2010). Ao mesmo tempo, citocinas produzidas pelas células imunes também são capazes de modular a liberação de moléculas bioativas pelo SNC, incluindo neurotransmissores (Jean-Gilles *et al.*, 2010). Um exemplo dessa comunicação entre sistemas provém de células imunes – e em especial macrófagos – que liberam metabólitos do ácido araquidônico quando estimuladas (Di Marzo *et al.*, 1996).

1.2 Encefalite causada pelo vírus Herpes simplex tipo 1

Uma grande área de pesquisa em Imunologia se concentra nos processos inflamatórios causados por agentes virais no SNC. Dentre os patógenos humanos mais comuns, está o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). O HSV-1 pertence à família *Herpesviridae*, cujos membros incluem o vírus Epstein-Barr, Varicela-Zoster, e o citomegalovírus (Paludan *et al.*, 2011). Sendo um vírus DNA altamente incidente em humanos, estima-se que aproximadamente 90% da população mundial seja portadora do HSV-1 (Wald & Corey, 2007). De forma geral, a infecção primária pelo HSV-1 provoca perturbações epidérmicas periféricas que aparecem em forma de lesões

vesiculares (úlceras com formação de líquido e crosta), na pele e em mucosas, que desaparecem em cerca de 7 a 13 dias. Após a infecção primária pela pele ou mucosa, o HSV-1 entra nos neurônios sensoriais periféricos, sendo transportado via fluxo axonal retrógrado; atinge o núcleo (em geral localizado no gânglio trigeminal) onde estabelece latência e permanece assintomático até o próximo episódio de reativação. As principais propriedades desse vírus são a capacidade de latência em tipos celulares específicos do hospedeiro e a habilidade de causar infecção lítica em células que suportam a replicação viral. Morfologicamente, o vírion do herpes possui DNA de cadeia dupla, um capsídeo que envolve o genoma, uma camada amorfa de proteínas que compõem o tegumento e uma membrana externa (envelope) que incorpora glicoproteínas, tal como representado pela Figura 1 (Paludan *et al.*, 2011).

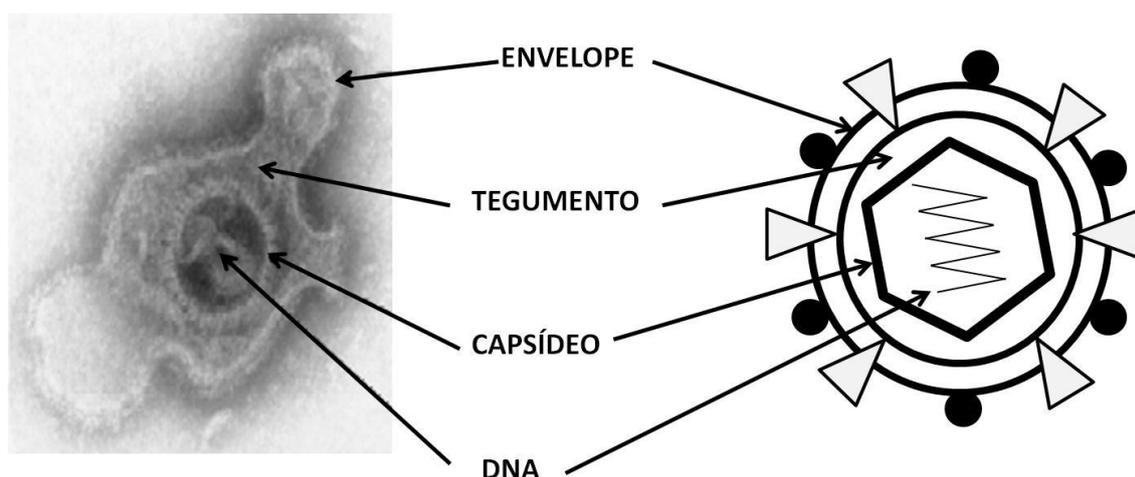


Figura 1. Morfologia do vírus Herpes simplex tipo 1. À esquerda: partícula viral visualizada por microscopia eletrônica de transmissão. À direita: representação esquemática mostrando o interior do envelope e capsídeo. Adaptado de Rozenberg, Deback & Agut, 2011.

A complicação mais grave da infecção por HSV-1 é a encefalite herpética (HSE), que pode acometer pacientes imunocomprometidos ou neonatos na proporção de 2 a 4 casos/milhão de habitantes/ano, resultando em uma taxa de mortalidade de 70% se não for tratada (Rozenberg *et al.*, 2011). A HSE leva ao desenvolvimento de sintomas como febre, cefaleia, confusão mental e crises convulsivas; eventualmente aparecem alucinações olfatórias e/ou gustativas, com a possibilidade de evolução do quadro sob a forma de afasia e hemiparesias (Baringer, 2008). Mesmo quando o tratamento é bem-

sucedido, é possível a permanência de sequelas neurológicas como perda da memória anterógrada, anosmia e disfasia (Armien *et al.*, 2010).

O HSV-1 é um vírus neurotrófico que afeta particularmente neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, alcançando-os por vias neuroanatômicas ao longo dos nervos trigeminal e olfatório (Baringer, 2008). Quando o vírus deixa o gânglio trigeminal e alcança o tecido neuronal, o DNA viral e as proteínas de tegumento do vírion (Figura 1) são transferidos para o núcleo da célula hospedeira para dar início à transcrição de genes virais, replicação do genoma e formação do capsídeo (Ku *et al.*, 2011) (Figura 2). A replicação viral resulta em morte celular e o desenvolvimento da resposta inflamatória. Em nível histológico, a HSE na maior parte dos casos acarreta em lesões necróticas e hemorrágicas, distribuídas na região fronto-temporal (Conrady *et al.*, 2010). Os prejuízos funcionais da HSE em longo prazo correspondem às lesões permanentes que afetam os núcleos amigdalóides, hipocampo, ínsula e giros orbital e cíngulo, no cérebro de pacientes humanos (Armien *et al.*, 2010).

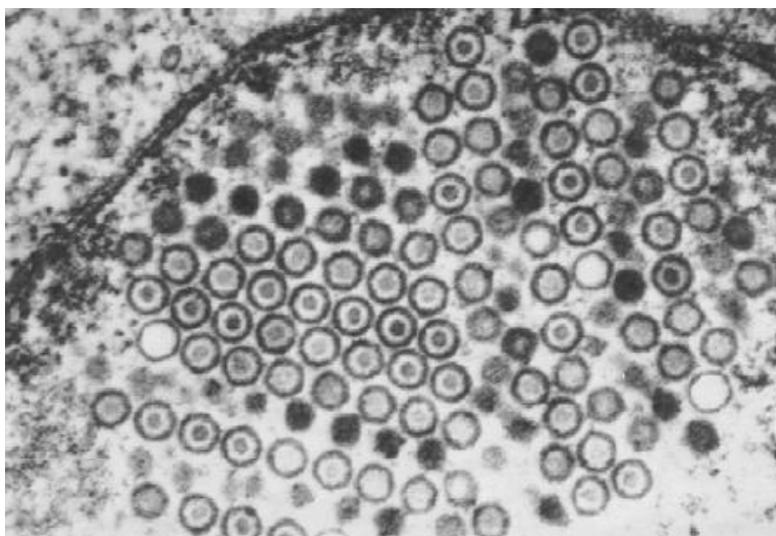


Figura 2. Vírions HSV dentro do núcleo de uma célula infectada. A membrana nuclear aparece no canto superior esquerdo da figura. Fonte: Baringer, 2008.

O controle da infecção pelo HSV-1 é alcançado tanto por mecanismos da resposta imune inata quanto da adaptativa. Em linhas gerais, durante a resposta inata o controle da infecção primária pelo HSV-1 requer a expressão de interferons do tipo I (IFN- α /IFN- β), recrutamento de leucócitos (células *natural killer* - NK) e culmina na indução de respostas específicas de células T

que controlam a replicação viral ao produzir citocinas e provocar a lise de células infectadas (Wuest & Carr, 2008). Uma vez que o vírus invade a célula, inicia-se a tentativa de replicação viral. Imediatamente, a ação de macrófagos (predominantes no infiltrado inflamatório ganglionar) e de células T do tipo CD8⁺ (essenciais à resposta imune adaptativa ao vírus) evitam a síntese proteica e a replicação propriamente dita (Paludan *et al.*, 2011). Outro importante elemento da resposta imune adaptativa ao HSV-1 são as células do tipo T *helper* 1 (Th1). Nessa resposta, células T auxiliares produzem IFN- γ , que contribui para a estratégia não-citolítica de remoção de vírus (Paul *et al.*, 2007), e estimulam células com atividade citolítica, como macrófagos e mais células T CD8⁺, capazes de conter a replicação viral (Liu *et al.*, 2000). Uma das desvantagens do envolvimento de células T do tipo CD8⁺ é a destruição de células infectadas pelo vírus, em maioria neurônios, contribuindo assim para a neuropatologia associada à HSE. Em decorrência da resposta imune desencadeada no SNC após invasão pelo HSV-1, tem-se cogitado que a patogênese da HSE esteja ligada ao papel deletério que a liberação descontrolada de mediadores inflamatórios desempenha sobre o tecido cerebral (Rozenberg *et al.*, 2011).

1.3 Estudo da encefalite herpética por meio de modelos animais

Modelos animais de infecção pelo HSV-1 são particularmente úteis no entendimento da patofisiologia de doenças causadas por este vírus e para o desenvolvimento de novas e mais eficientes terapias. Alguns modelos de infecção por HSV-1 utilizam a rota intranasal (Ashcraft *et al.*, 2008) ou corneal (Wickham *et al.*, 2005; Dong-Newsom *et al.*, 2010). Nesses modelos, o vírus segue uma rota retrógrada de disseminação através dos nervos e aloja-se no gânglio trigeminal ou no bulbo olfatório (Esiri, 1982). Eventualmente o vírus pode alcançar o tecido cerebral e causar um quadro de encefalite herpética. Contudo, o desenvolvimento de um modelo animal adequado para a HSE deve mimetizar também a rápida evolução da doença, que é uma característica importante do acometimento de pacientes humanos pelo HSV-1.

O modelo de encefalite herpética induzida por via intracranial em camundongos (Vilela *et al.*, 2008) tem sido uma ferramenta útil no estudo dessa doença, por adequar-se à diferença de suscetibilidade ao vírus em camundongos C57BL/6 e por provocar em animais os sinais da HSE encontrados em humanos. Os sinais clínicos da encefalite herpética nos camundongos incluem ataxia, perda de peso, postura arqueada, hipolocomoção e/ou ambulação irregular, lesões oculares, piloereção e tremores, além de convulsões e coma, nos estágios terminais da doença (Kopp *et al.*, 2009; Vilela *et al.*, 2010).

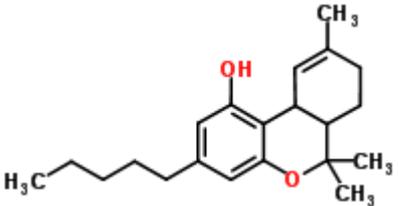
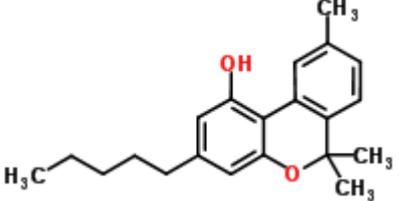
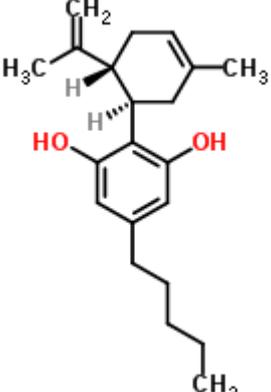
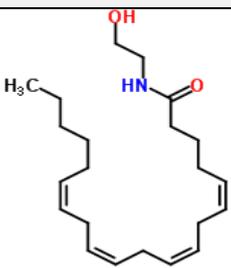
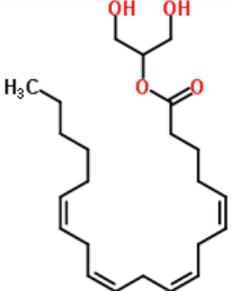
A inoculação direta do vírus no cérebro produz sintomas observáveis poucos dias após a infecção. Localmente, o organismo inicia uma cascata de eventos em decorrência da invasão do patógeno. Uma vez que reações imunes locais exacerbadas podem causar danos irreversíveis às células neurais, o SNC possui mecanismos de proteção tais como a inibição da excitabilidade celular e diminuição da liberação de glutamato e outros neurotransmissores (Benito *et al.*, 2008). A ativação do sistema endocanabinoide é outro exemplo de mecanismo protetor, atuando sobre glia e neurônios para inibir a expressão de citocinas inflamatórias e promover a liberação de citocinas anti-inflamatórias, modulando assim a resposta inflamatória (Benito *et al.*, 2008).

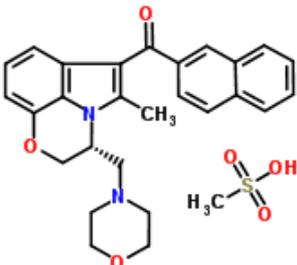
1.4 O Sistema Endocanabinoide

A planta *Cannabis sativa* tem sido utilizada pelo homem há milhares de anos, tanto por suas fibras quanto por propriedades psicotrópicas e terapêuticas (Ameri, 1999). Seu uso já esteve ligado a rituais religiosos e hoje o consumo da cannabis é proibido em muitos países por ser considerada uma droga de abuso. Desde a descoberta do Sistema Endocanabinoide, uma refinada rede de neurotransmissão composta por receptores ativados por substâncias presentes na planta e por análogos produzidos endogenamente, a cannabis tem despertado o interesse crescente de pesquisadores de todas as áreas do conhecimento. A partir do isolamento do principal componente psicoativo presente na planta, o Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) (Mechoulam &

Gaoni, 1965), cerca de 60 outras substâncias extraídas da planta foram isoladas e descritas como fitocanabinoides.

Quadro 1. Principais canabinoides.

FITOCANABINOIDES		
Δ-9-Tetrahydrocannabinol (THC)		Agonista parcial de receptores canabinoides; propriedades psicoativas e imunomodulatórias.
Canabinol		Substância não-psicotrópica encontrada em plantas do gênero <i>Cannabis</i> ; possui afinidade por ambos receptores CB ₁ e CB ₂ .
Canabidiol		Substância mais abundante no extrato da planta; apresenta baixa afinidade por CB ₁ ou CB ₂ .
ENDOCANABINOIDES		
Anandamida		Agonista endógeno de CB ₁ e CB ₂
2-AG		Agonista endógeno de CB ₁ e CB ₂

CANABINOIDES SINTÉTICOS		
WIN55,212-2		<p>Agonista total de receptores canabinoides; afinidade discretamente maior por CB₂</p>

O passo seguinte rumo ao conhecimento da farmacologia do sistema endocanabinoide foi dado por Devane e colegas (1988), ao caracterizarem pela primeira vez um receptor sensível aos canabinoides, que foi denominado CB₁. Os receptores CB₁ são expressos mais densamente no SNC, especialmente em áreas límbicas responsáveis pela nocicepção e memória de curto prazo e nos núcleos da base (Pertwee, 1999). O receptor CB₁ está relacionado a todas as maiores classes de neurotransmissores e regula a liberação de transmissores inibitórios e excitatórios em estruturas cerebrais implicadas em respostas emocionais, tais como hipocampo, hipotálamo, amígdala e córtex pré-frontal (Herkenham *et al.*, 1991; Freund *et al.*, 2003). Dentre as aplicações terapêuticas atribuíveis à ativação do receptor CB₁ encontra-se a atenuação de náuseas e vômitos causados por quimioterapia, ação analgésica e estimulação do apetite em síndromes consumptivas (Howlett, 2002). Entretanto, associados a estes benefícios clínicos existem efeitos psicotrópicos imprevisíveis como alterações na cognição e memória, disforia/euforia e sedação, resultantes da ativação farmacológica dos receptores CB₁ (Howlett, 2002).

Outro subtipo de receptor canabinoide, o CB₂, foi originalmente descrito como um receptor “periférico”, pois foi encontrado nos tecidos do sistema imune como baço, tonsilas e timo, bem como em leucócitos e mastócitos (Galiegue *et al.*, 1995). Ambos CB₁ e CB₂ são receptores metabotrópicos que possuem sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G_{i/o}; entretanto, a distinção entre esses dois tipos de receptores é feita com base em suas sequências de aminoácidos, mecanismos de sinalização, distribuição tecidual e sensibilidade a certos agonistas e antagonistas (Howlett, 2002). O papel do receptor CB₂ sobre a modulação de respostas neuroinflamatórias tem sido extensamente investigado, pois este receptor pode alterar o curso da resposta inata e adaptativa contra patógenos, regulando negativamente a

ativação de monócitos e microglia, além de evidências apontarem para a expressão deste receptor em células do SNC em condições inflamatórias (Klein *et al.*, 2003; Cabral & Griffin-Thomas, 2009). Estima-se que haja outros tipos de receptores canabinoides além dos subtipos CB₁ e CB₂, capazes de serem ativados por ligantes canabinoides, ainda sob investigação (Begg *et al.*, 2005).

Os ligantes endógenos para receptores canabinoides são chamados endocanabinoides, pertencentes à classe dos eicosanoides e outros derivados de ácidos graxos (Quadro 1). De forma geral, acredita-se que os ligantes endocanabinoides sejam sintetizados no neurônio pós-sináptico pela clivagem de ácidos graxos de membrana (em particular do ácido araquidônico) em resposta a um influxo de cálcio, e funcionem como mensageiros retrógrados por atravessar inversamente a fenda sináptica para ativar receptores CB₁ localizados nos terminais axonais, o que por sua vez resulta na supressão da liberação de outros neurotransmissores (McLaughlin *et al.*, 2007).

Dois dos endocanabinoides considerados arquétipos no estudo do sistema endocanabinoide são a araquidonoiletanolamida (anandamida, AEA) e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG). As ações farmacológicas e os efeitos sobre o comportamento derivados da anandamida indicam similaridade aos efeitos do THC, e ambos são considerados agonistas parciais do receptor CB₁ (Russo & Guy, 2006).

Diversos análogos sintéticos da AEA e do THC têm sido desenvolvidos e utilizados em pesquisas experimentais, na busca por fins terapêuticos com o mínimo de efeitos adversos. Drogas que têm perfil farmacológico semelhante ao THC são chamadas canabimiméticas, por produzirem uma tétrade de efeitos característicos do THC em ensaios *in vivo*, isto é, hipomotilidade, hipotermia, analgesia e imobilidade postural sustentada (catalepsia). A droga (R)-(+)-WIN 55,212-2 sal mesilato (doravante WIN55,212-2), pertencente à classe das aminoalquilindolas, é uma droga canabimimética, desenvolvida inicialmente como um agente anti-inflamatório e analgésico, e só posteriormente foi descoberta sua propriedade de ligar-se a receptores canabinoides, com afinidade discretamente maior para o receptor CB₂ do que para CB₁ (Compton *et al.*, 1992). A ativação de receptores CB₁ pelo WIN55,212-2 promove um repertório de eventos semelhantes àqueles provocados pelo THC, que incluem o bloqueio de canais para Ca²⁺ voltagem-

dependentes, redução da liberação de neurotransmissores (glutamato e ácido gama-aminobutírico - GABA), inibição da produção de cAMP e redução da síntese de NO, diminuição dos efeitos mediados pela proteína quinase A, potenciação da via de sinalização pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e ativação de canais para potássio (Jean-Gilles *et al.*, 2010).

Os níveis de endocanabinoides são controlados pela ação de duas enzimas: a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a monoacilglicerol lipase (MAGL) as quais degradam a AEA e o 2-AG, respectivamente (De Petrocellis & Di Marzo, 2009).

1.5 Modulação da resposta inflamatória central por drogas canabinoides

Tanto canabinoides endógenos quanto exógenos podem influenciar o curso de infecções *in vivo* e *in vitro*. Durante a resposta imune inata, as células imunes aumentam a produção de endocanabinoides, notadamente AEA e 2-AG, que atuam como agentes quimiotáticos em conjunto com quimiocinas (Klein, 2005). Além disso, o 2-AG tem sido implicado nos processos neuroinflamatórios como um inibidor endógeno da ciclooxigenase-2 (COX-2), dessa forma resultando em efeito protetor sobre neurônios potencialmente expostos a eventuais danos causados pelos processos inflamatórios no compartimento cerebral (Zhang & Chen, 2008).

Outra modificação em células do sistema imune é o aumento da expressão de receptores canabinoides CB₂ em resposta a determinados estímulos inflamatórios (Benito *et al.*, 2008). A resposta das células que expressam CB₂ pode influenciar não só os processos intracelulares, como também pode modificar a resposta imune inata e adaptativa do organismo frente a patógenos, suprimindo a inflamação e o desenvolvimento de mecanismos celulares e humorais contra vírus (Cabral & Griffin-Thomas, 2009). Leucócitos apresentam um padrão de expressão de receptores CB₂ maior do que de receptores CB₁, sendo que células B expressam mais receptores canabinoides do que células T (Roth *et al.*, 2002). Além deste fato, sabe-se que a microglia também expressa receptores canabinoides CB₁ e CB₂, além de

portar traços fenotípicos de macrófagos, tais como a capacidade de fagocitar patógenos (Cabral & Marciano-Cabral, 2005; Hauwel *et al.*, 2005).

Diversos estudos sugerem que canabinoides alteram o equilíbrio na produção de citocinas por parte da glia e de células de perfil Th1 e Th2 (Nagarkatti *et al.*, 2009). Enquanto a atividade de células Th1 é suprimida, ocorre o aumento da atividade de células Th2 (Klein, 2005). O resultado é a inibição da expressão de moléculas como IL-1, IL-2, TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ e NO, além da liberação das citocinas IL-4 e IL-10 (Croxford & Yamamura, 2005), o que promove mudança de uma resposta pró-inflamatória para uma resposta anti-inflamatória. Em um estudo *in vitro*, o WIN55,212-2 foi capaz de suprimir a produção de mediadores inflamatórios ativados por IL-1 β em astrócitos humanos (Sheng *et al.*, 2005). Outro importante trabalho evidenciou a supressão de interferons do tipo I em camundongos tratados com THC (15-100 mg/kg) anteriormente à inoculação de vírus herpes simplex tipo 2 (Cabral *et al.*, 1986).

Além das evidências de que os canabinoides exercem atividade anti-inflamatória, é possível que o sistema endocanabinoide constitua também uma estratégia de neuroproteção contra danos irreversíveis ao SNC. Isto seria possível por meio da modulação da atividade glial, inibição da transmissão glutamatérgica, redução do influxo de cálcio e a subsequente inibição de cascatas de reações citotóxicas, e pelo controle do estresse oxidativo (Burstein & Zurier, 2009; Tanasescu & Constantinescu, 2010; Downer, 2011). A AEA tem demonstrado a capacidade de proteger neurônios contra danos causados pela inflamação (Eljaschewitsch *et al.*, 2006). Em modelo de encefalomielite experimental autoimune, o tratamento com WIN55,212-2 melhorou a progressão dos sintomas clínicos em camundongos e exerceu efeitos terapêuticos (Croxford & Miller, 2003). Em publicação de Solbrig *et al.* (2010), a administração sistêmica de 1 mg/kg de WIN55,212-2 por via intraperitoneal (i.p.) promoveu a oligodendroglíogênese durante o curso da encefalite causada pelo vírus da Doença de Borna em ratos, sugerindo um papel neuroprotetor contra danos celulares em modelos de encefalite virais.

A ação anti-inflamatória dos canabinoides pode modular as respostas inflamatórias do hospedeiro contra infecções virais agudas, sendo benéfica em casos de infecções persistentes (Reiss, 2010). Embora o receptor CB₂ seja o

suposto cerne das investigações acerca do papel imunomodulatório dos canabinoides (Cabral & Griffin-Thomas, 2009), em modelos de infecções virais o receptor CB₁ também deve ser explorado, devido a sua expressão em neurônios e astrócitos, que consistem nos alvos principais de vírus neurotrópicos como o HSV-1. Eljaschewitsch *et al.* (2006) encontraram evidência de que a AEA é capaz de suprimir a liberação de NO pela microglia no cérebro inflamado, e que este efeito possa ser obtido pela interação com receptores CB₁ e CB₂. O NO possui grande importância funcional ao inibir a replicação viral de vírus como o HSV-1 (Komatsu *et al.*, 1996). Especula-se que em modelos de infecção em que a replicação viral seja sensível a inibição proporcionada pelo NO, os canabinoides possam aumentar a replicação viral e a gravidade da doença; já em infecções virais onde a inflamação é deletéria, drogas canabinoides podem ter papel terapêutico (Herrera *et al.*, 2008).

Desta forma, o envolvimento do sistema endocanabinoide nas respostas inflamatórias a insultos virais no SNC deve ser estudado caso a caso, tomando-se como pontos de partida as variáveis do modelo experimental, da ferramenta farmacológica utilizada e da natureza do patógeno.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com dados da literatura que apontam o papel modulador do sistema canabinoide sobre as respostas imunes, a pesquisa justifica-se pela gravidade dos sintomas da encefalite herpética, manifestados dentro de um curto período de tempo; pelo alto risco de sequelas cognitivas provocadas pela doença mesmo quando tratada e pelo fato de que, em diversos modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*, os canabinoides têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios, neuroprotetores e a capacidade de interferir sobre a replicação viral. Contudo, a ação imunomoduladora dos canabinoides também pode prejudicar a resistência do hospedeiro contra infecções, sendo necessária a investigação do papel modulador de drogas que atuam sobre o sistema endocanabinoide neste modelo específico de neuroinflamação. Para esta investigação, utilizou-se o agonista canabinoide WIN55,212-2 em regime de administração sistêmica (via intraperitoneal, i.p.).

Os efeitos do tratamento com canabinoides e a participação dos endocanabinoides sobre o desenvolvimento da encefalite herpética ainda não foram elucidados; sendo assim, a pesquisa foi desenvolvida também com o intuito de investigar se os canabinoides constituem uma possibilidade terapêutica para infecções do SNC causadas pelo HSV-1.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel do agonista canabinoide WIN55,212-2 na modulação de respostas inflamatórias resultantes da encefalite herpética, induzida em camundongos selvagens C57BL/6 pela inoculação intracranial do vírus HSV-1.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os parâmetros comportamentais de memória e ansiedade em animais infectados tratados e não tratados.
- b) Estudar o efeito do tratamento com o agonista canabinoide WIN55,212-2 sobre o curso da encefalite herpética em camundongos da linhagem C57BL/6.
- c) Correlacionar os dados obtidos nos testes comportamentais com dados obtidos a partir da análise da perda neuronal e tecidual.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Os animais utilizados foram camundongos machos da linhagem C57Bl/6 (Espécie: *Mus musculus*) com idade entre 8 e 12 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em biotério próprio, em ciclo claro-escuro de 12h/12h, temperatura e umidade constantes, dispondo de água e comida *ad libitum*, sendo respeitadas as normas gerais para a utilização de animais de experimentação estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), protocolo nº 20/2011 (Anexo I).

4.2 Tratamento

A droga usada no tratamento dos animais foi o agonista canabinoide WIN55,212-2 (Sigma Aldrich, EUA / Cayman Chemical, EUA), cedido pelo Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFMG. Devido à característica lipofílica do WIN55,212-2, foi necessário diluí-lo em solução de Cremophor[®] (Sigma-Aldrich, EUA), DMSO (Dimetilsulfóxido, LabSynth, Brasil) e PBS estéril (solução salina tamponada por fosfato, pH 7,4) na proporção de 1:1:18, proporção esta que, de acordo com a literatura (Brito, 2007; Benamar *et al.*, 2008), não apresenta efeitos biológico apreciáveis e que também foi utilizada como solução veículo para o grupo controle. A dose de WIN55,212-2 utilizada neste estudo foi definida em 1 mg/kg, segundo dados da literatura (Pamplona & Takahashi, 2006; Bambico *et al.*, 2007; Marchalant *et al.*, 2007; Baek *et al.*, 2009), para que fosse possível obter efeitos sobre a resposta inflamatória sem que houvesse prejuízos nos testes comportamentais devido à atividade psicotrópica do canabinoide. A droga foi administrada por via i.p., em volume de 1 mL/kg, sempre ao início da fase escura do ciclo circadiano. A duração do tratamento teve início um dia antes da infecção (-1 dpi) e término no 4º dpi em

todos os experimentos (Figura 6). O Quadro 2 descreve os grupos experimentais e os respectivos tratamentos administrados.

Quadro 2. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

CTRL+VEH	Grupo de animais controles não infectados que receberam injeções de solução veículo.
CTRL+WIN	Grupo de animais não infectados que receberam tratamento com WIN55,212-2, 1mg/kg via i.p.
HSV+VEH	Grupo de animais infectados com HSV-1 que receberam injeções de solução veículo.
HSV+WIN	Grupo de animais infectados com HSV-1 que receberam tratamento com WIN55,212-2, 1mg/kg via i.p.

4.3 Indução da encefalite herpética

Utilizou-se como inóculo uma amostra viral HSV-1 cepa EK, isolada de paciente humano, obtida do Laboratório de Vírus (ICB/UFMG). Os animais foram anestesiados previamente com mistura de ketamina (150 mg/Kg; Vetbrands, Brasil) e xilazina (10 mg/kg; Syntec, Brasil). A partir da anestesia e assepsia do local, foram inoculados intracranialmente 10^2 PFU do vírus HSV-1 suspensos em 10 μ L de PBS no lado direito da sutura sagital, ao nível dos olhos, utilizando-se uma seringa de 30 unidades e agulha de 29 G, de acordo com protocolo de Vilela *et al.* (2008). O dia da inoculação viral foi considerado o dia 0 pós-infecção (0 dpi).

4.4 Bateria SHIRPA

A Bateria SHIRPA (*SmithKline/Harwell/Imperial College/Royal Hospital/Phenotype Assessment*) é uma ferramenta abrangente para avaliação fenotípica que envolve um conjunto de até 40 testes simples, executados utilizando-se material padronizado (caixa de polipropileno transparente de 55 cm x 33 cm, cilindro de acrílico transparente de 15 cm de diâmetro e 11 cm de altura, grade de aço (malha de 1 cm²), proveta plástica transparente, arame de 20 cm de comprimento, pinça) em uma série de manipulações em que o

camundongo é avaliado na posição supina e pela suspensão e apreensão da cauda. Os testes examinam funções autonômicas, espinocerebelares, neuropsiquiátricas e motoras. O protocolo SHIRPA de análise primária foi adaptado de Rogers *et al.* (1997; 2001) e foi utilizado para avaliar mudanças comportamentais e o surgimento de sinais clínicos indicativos de encefalite herpética em camundongos, durante o curso da infecção. Os animais foram avaliados diariamente de -1 dpi até a data de óbito, em escala de pontuação para cada teste adaptada de Hatcher *et al.* (2001) gerando dados que foram agrupados em eixos funcionais segundo Lackner *et al.* (2006) (Quadro 3).

Quadro 3. Parâmetros constituintes de cada uma das cinco categorias funcionais utilizadas na interpretação dos resultados do SHIRPA.

<i>Categoria funcional</i>	<i>Parâmetros</i>
Reflexo e função sensorial	Posicionamento visual, reflexo auricular (pinna reflex), reflexo corneal, beliscada dos dedos da pata traseira, reflexo de endireitamento.
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, mordida, medo, irritabilidade, agressão, vocalização.
Comportamento motor	Posicionamento corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, ambulação, elevação da cauda, encurvamento do tronco, segurar as patas traseiras, manobra no arame, geotaxis negativa.
Função autonômica	Taxa de respiração, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, cor da pele, frequência cardíaca, lacrimejamento, salivação.
Tônus muscular e força	Força ao agarrar, tônus corporal, tônus dos membros, tônus abdominal.

Adaptada de Lackner *et al.* (2006).

4.5 Modelos animais preditivos de comportamento tipo-ansioso e de memória

a) Teste de Esquiva Inibitória (Step Down Inhibitory Avoidance Test).

Protocolo adaptado de Izquierdo *et al.* (1999). Cada camundongo foi colocado individualmente sobre a plataforma elevada da caixa de esquiva inibitória de uma via para camundongos (Insight Ltda.) em três diferentes sessões e a latência para que o animal descesse da plataforma foi mensurada em segundos. Na etapa de treino, os camundongos adquiriram a memória do estímulo aversivo recebendo um choque elétrico nas patas (2000 mA por 2 segundos) ao descer sobre o assoalho da caixa. Cada camundongo foi imediatamente retirado do aparelho. Uma hora e meia após o treino, o animal foi novamente colocado sobre a plataforma e a latência de descida foi mensurada (índice que avalia a memória de curto prazo), sendo que não houve mais choques nas patas. Vinte e quatro horas depois, o animal foi novamente posicionado na caixa e a latência de descida foi registrada como um índice de memória de longo prazo. A caixa foi limpa com álcool 70% após cada sessão.

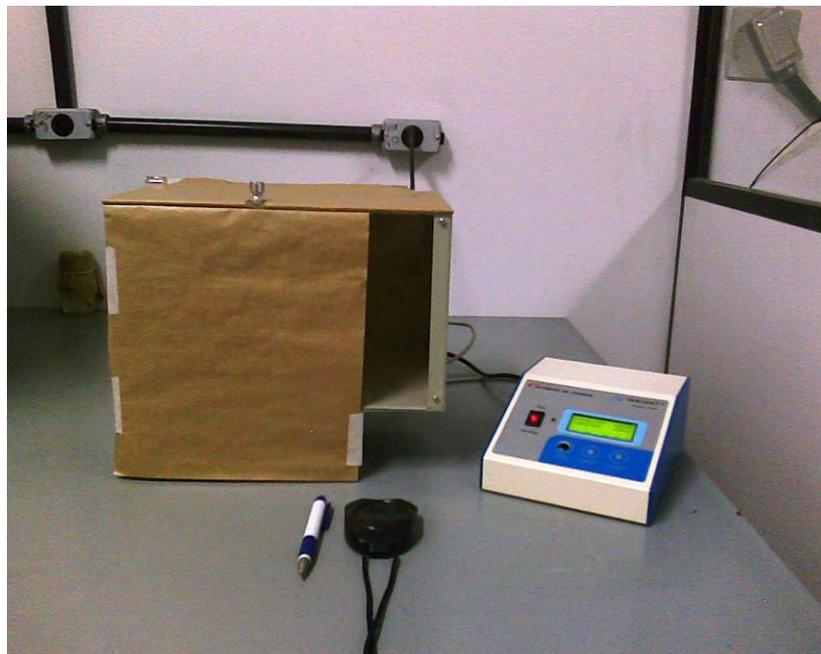


Figura 3. Fotografia do aparelho utilizado no Teste da Esquiva Inibitória.

b) Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*)

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo de Pobbe *et al.* (2011). O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) consiste de dois braços abertos e dois braços fechados por paredes laterais medindo 17 cm de altura. Cada braço mede 30 cm de comprimento por 6 cm de largura, posicionados a uma altura de 31 cm do solo. O camundongo foi colocado na região central, de frente para um dos braços fechados, permitindo-se livre exploração do aparelho por um período de 5 minutos. Durante este tempo, registrou-se os tempos despendidos nas explorações dos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas com as quatro patas em cada um dos braços. O LCE foi limpo com álcool etílico (70%) após cada sessão para remoção de pistas olfatórias. Os resultados são apresentados como a percentagem média de entradas nos braços abertos (%EBA) em relação ao número total de entradas nos braços abertos e fechados, e como a percentagem média do tempo gasto nos braços abertos (%TBA) em relação ao tempo total do experimento (300 segundos).

c) Teste de Reconhecimento Social (*Social Recognition Test - SRT*).

O protocolo utilizado foi adaptado de Kasahara *et al.* (2010). Inicialmente cada camundongo foi inserido numa caixa de plástico de 40 cm x 30 cm x 17 cm, forrada com maravalha limpa, durante 10 minutos para habituação ao ambiente experimental.

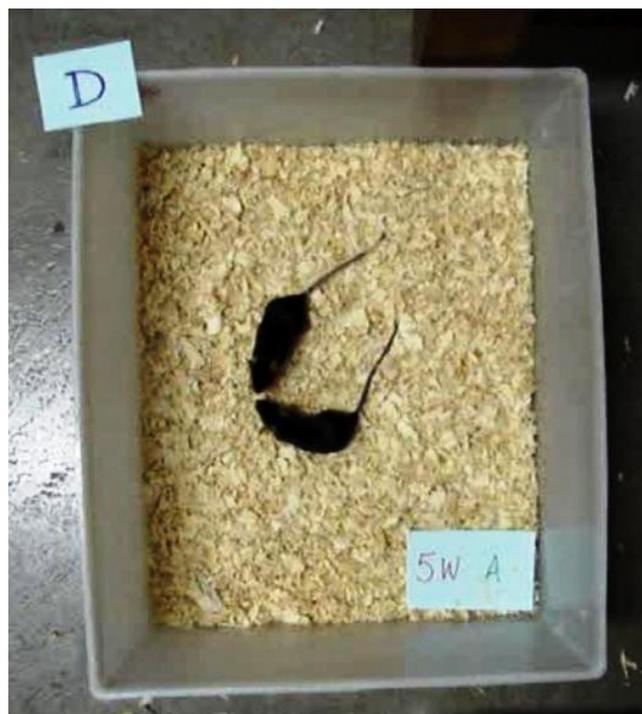


Figura 4. Imagem registrada durante o Teste de Reconhecimento Social.

Após a habituação ao ambiente, um animal jovem de mesma linhagem e sexo (Animal C) foi acrescentado à caixa por 3 minutos e registrou-se o tempo gasto em interação social entre o animal testado e o intruso (*i.e.*, contato corporal à distância menor/igual a 1cm, investigação oro-genital, comportamentos de limpeza direcionados ao intruso). Esta exposição de 3 minutos ao intruso se repetiu 3 vezes, com intervalos de 10 minutos entre as sessões. Na quarta sessão, foi inserido um animal completamente desconhecido ao animal testado (Animal D), e o tempo de exploração deste novo indivíduo foi registrado também durante 3 minutos. O desenho experimental deste teste encontra-se abaixo:

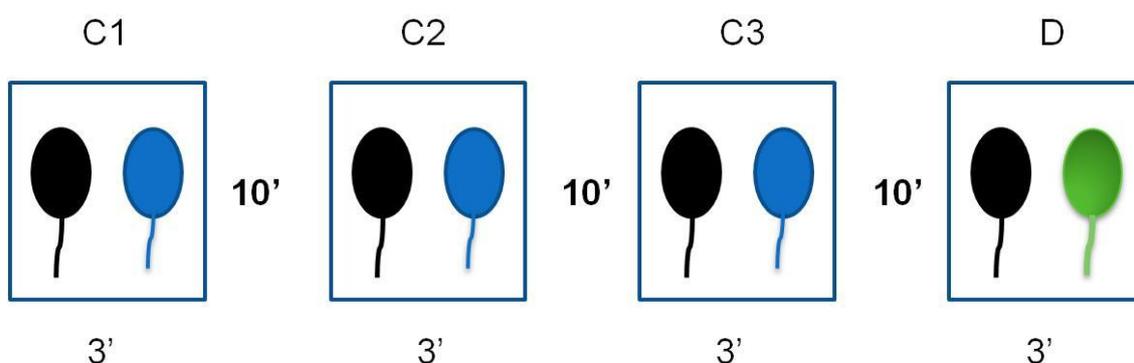


Figura 5: Esquema do protocolo utilizado para o Teste de Reconhecimento Social.

4.6 Eutanásia

O método de eutanásia adotado foi o deslocamento cervical após anestesia (mistura de ketamina e xilazina via i.p., 150 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente), realizado por pesquisadores treinados, no 4º dpi (exceto animais destinados à análise de perda neuronal, que foram eutanasiados no 3º dpi).

4.7 Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

O hemisfério esquerdo do cérebro dos camundongos infectados e controles, tratados ou não, foram retirados e acondicionados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram pesadas (100 mg) e colocadas em 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; BSA 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,89 g diluídos em 1 litro) para preparação do homogenato. Os tecidos foram macerados por um homogeneizador próprio em velocidade adequada e a solução resultante foi centrifugada a 10000 rpm, por 10 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

4.8 Ensaio de ELISA para detecção de citocinas e quimiocinas

Os kits para ELISA (DuoSet) para citocinas de camundongo foram obtidos da R&D Systems (EUA) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWellTMPlates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As concentrações de citocinas 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/poço de uma solução contendo concentração adequada do anticorpo de 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 4 vezes com solução de PBS e Tween 20 a 0,1%, em um lavador de placas automático (ELX50, BioTek Instruments, Inc.). Logo após, foram adicionados 200 µL/poço de solução de bloqueio PBS:BSA 1%. O tempo de bloqueio foi de 2 h sob agitação constante. Foram adicionados os padrões das citocinas em concentração calculada previamente e as amostras em duplicata. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4 °C. Após nova lavagem, foram adicionados 100 µL/poço de uma solução de anticorpo de detecção, biotilado e específico para cada molécula. As placas foram incubadas por uma hora e foram lavadas em seguida. Na próxima etapa foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (1:4000; HRP, Pharmingen). Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e depois adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich, EUA) e H₂O₂ (Merck, Alemanha). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 M. 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 490 nm. A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente.

4.9 Determinação da viabilidade neuronal

Após eutanásia, o cérebro dos camundongos foi removido rapidamente, os hipocampus foram dissecados e colocados em solução de líquido cerebrospinal artificial (LCEA) previamente resfriada a 4 °C e aerada com mistura de oxigênio (95%) e dióxido de carbono (5%). Cada hipocampo foi seccionado em fatias de 400 µm no fatiador de tecidos. Para analisar a viabilidade celular das fatias, as mesmas foram coradas com 4,5 µL de etídeo homodímero-1 (2 mM) diluídos em 1,5 mL de meio de incubação aerado previamente com mistura carbogênica. Essa solução de marcação foi dividida em placas de 35 mm, sendo uma placa para as fatias da condição controle

(CTRL+VEH), outra para as fatias da condição de HSE sem tratamento (HSV+VEH) e outras para as fatias das condições de HSE com tratamento com WIN55,212-2 (HSE+WIN). As fatias foram mantidas nessa solução de marcação por 30 minutos. Após isso, elas foram lavadas com 2 mL de meio de incubação aerado por 15 minutos. Depois da lavagem, as fatias foram colocadas em uma câmara de perfusão para microscópio e foram analisadas utilizando o microscópio Axiovert Zeiss 200M acoplado ao sistema APOTOME (Zeiss®, Alemanha).

4.10 Obtenção de imagens no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME

No microscópio foram adquiridas imagens de secções ópticas consecutivas ao longo do eixo Z, com espessura de 2 μm , com comprimentos de onda de excitação de 568 nm para o etídeo homodímero e emissão em 598/40. As imagens foram adquiridas com saturação da fluorescência. A lâmpada utilizada foi de mercúrio. Estes parâmetros foram mantidos em todo o procedimento.

4.11 Quantificação das imagens obtidas no Microscópio de Fluorescência acoplado ao sistema APOTOME

Para a realização da análise quantitativa, foi utilizada o programa de processamento de imagens ImageJ (NIMH, Maryland, EUA). As imagens foram submetidas a um processamento através de um filtro de ajuste de pixels pela mediana, com o intuito de reduzir possíveis interferências de ruído, e foram obtidos os histogramas das respectivas imagens. Com o histograma da imagem foi determinado o valor do limiar basal da fluorescência. Após esse processamento da imagem, a região CA1 foi selecionada com uma área pré-determinada e, assim, foi realizada a quantificação manual do número de células mortas presentes.

4.12 Histologia

Após eutanásia no 4º dpi, o hemisfério direito do cérebro de cada animal foi coletado e imerso em uma solução de formalina 10% tamponada. 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 µm 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, Alemanha) 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 em que cada área cerebral recebeu um escore dentro de uma escala de 0 a 4 pontos: 0 = nenhuma patologia; 1 = destruição tecidual mínima e/ou inflamação leve/gliose; 2 = leve destruição tecidual e/ou inflamação moderada/gliose; 3 = destruição tecidual definitiva (perda neuronal, dano parenquimal) e inflamação intensa; 4 = necrose (perda total de todos os elementos teciduais com debris celulares associados) A inflamação meningeal foi examinada e graduada de maneira que 0 = nenhuma inflamação; 1 = uma camada celular de inflamação; 2 = duas camadas celulares de inflamação; 3 = três camadas celulares de inflamação; 4 = quatro ou mais camadas celulares de inflamação (Amaral *et al.*, 2011).

4.13 Tratamento estatístico dos dados

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA) e apresentados como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Para a curva de sobrevivência, foi utilizado o método estatístico de Kaplan-Meier, com teste Log-rank. Os resultados da perda ponderal foram representados sob a forma de porcentagem com relação ao peso inicial. Os dados obtidos pelo SHIRPA foram tratados utilizando-se ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. Os testes t de Student e ANOVA com pós-teste de Bonferroni foram utilizados para comparações múltiplas entre dois ou mais grupos, respectivamente. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4.14 Delineamento experimental

Etapa 1: Curva de letalidade e monitoramento de sinais clínicos usando a bactéria SHIRPA. Dois grupos de animais infectados (HSV+VEH, HSV+WIN; n=8 cada) foram monitorados diariamente para composição da curva de letalidade. O tratamento com WIN55,212-2 (WIN; 1 mg/kg) foi iniciado no dia

anterior à inoculação (-1 dpi) e todos os animais foram submetidos ao SHIRPA de -1 dpi até o término do experimento.

Etapa 2: Análise dos processos inflamatórios em curso na encefalite herpética, em animais tratados e não tratados. Quatro grupos (CTRL+VEH, CTRL+WIN, HSV+VEH, HSV+WIN) foram empregados nos experimentos desta etapa. No dia anterior à inoculação, iniciou-se o tratamento dos animais com WIN55,212-2 (ou veículo) que continuou até o 3º dpi. A eutanásia ocorreu no 4º dpi, com extração de fragmentos do cérebro dos animais para análise histológica e ELISA.

Etapa 3: Avaliação dos parâmetros comportamentais de memória e ansiedade em animais infectados tratados e não tratados e quantificação da perda neuronal no hipocampo. Nos experimentos desta etapa, três grupos experimentais (CTRL+VEH, HSV+VEH, HSV+WIN) foram submetidos ao regime de tratamento com canabinoide, iniciado em -1 dpi e cessado em 2 dpi. Nos 1º e 2º dpi os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais Teste de Esquiva Inibitória (Esquiva), Teste de Reconhecimento Social (SRT) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Os animais foram eutanasiados no 3º dpi para análise do tecido cerebral por microscopia de fluorescência. O número de animais por grupo nas etapas 2 e 3 é discriminado na seção de Resultados. A representação esquemática do delineamento experimental consta na ilustração abaixo.

	-1 dpi	0 dpi	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi
ETAPA 1	SHIRPA WIN	INOCULAÇÃO WIN	SHIRPA WIN	SHIRPA WIN	SHIRPA WIN	SHIRPA WIN
ETAPA 2	WIN	INOCULAÇÃO WIN	WIN	WIN	WIN	Eutanásia ELISA Histologia
ETAPA 3	WIN	INOCULAÇÃO WIN	Esquiva WIN	Esquiva LCE / SRT WIN	Eutanásia Microscopia	



Figura 6. Desenho experimental representando as etapas da pesquisa.

5. RESULTADOS

5.1 Curva de sobrevida

A curva de sobrevida foi traçada usando-se o método de Kaplan-Meier, a partir de dois grupos de 8 animais cada: um grupo de animais infectados que receberam veículo (HSV+VEH) e um grupo infectado que foi tratado com a droga canabinoide (HSV+WIN). As primeiras mortes em ambos os grupos infectados começaram a ocorrer no 4º dpi. No 6º dpi, não havia mais animais vivos no grupo infectado tratado (HSV+WIN). O último animal infectado não tratado morreu no dia 10 pós-infecção. Não houve, contudo, diferença estatística entre os dois grupos experimentais.

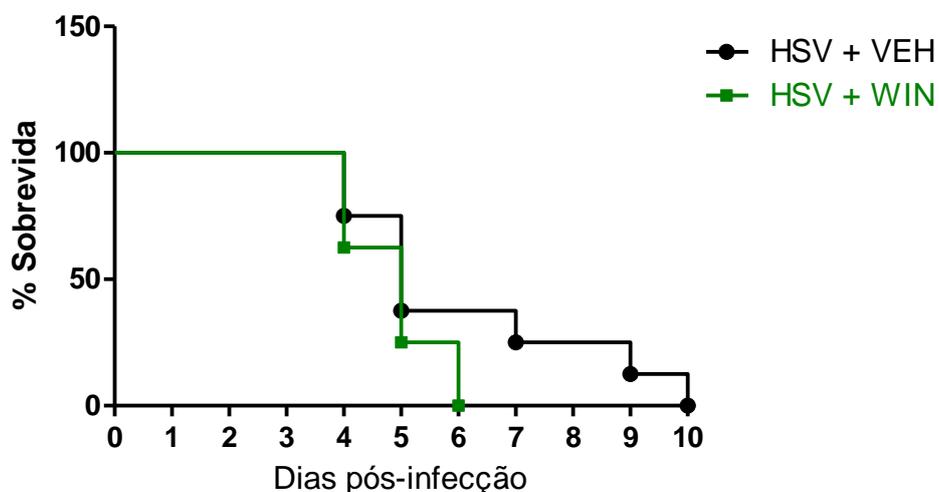


Figura 7. Curva de sobrevida de camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=8) *versus* camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=8). Os dados são apresentados como porcentagem de animais vivos a cada dia pós-infecção. Camundongos HSV+WIN apresentaram 100% de mortalidade aos 6 dpi, enquanto que camundongos HSV+VEH sobreviveram até 10 dpi. Teste Log-rank, $p = 0,1652$.

5.2 Sinais clínicos da encefalite herpética

Um dos principais sinais clínicos da HSE é a perda ponderal. Os resultados aqui apresentados indicam que os camundongos infectados tratados (HSV+WIN) tiveram maior perda ponderal ao 4º dpi (22,7%) do que os animais infectados não tratados (12,6%), com relação ao peso inicial médio de cada grupo.

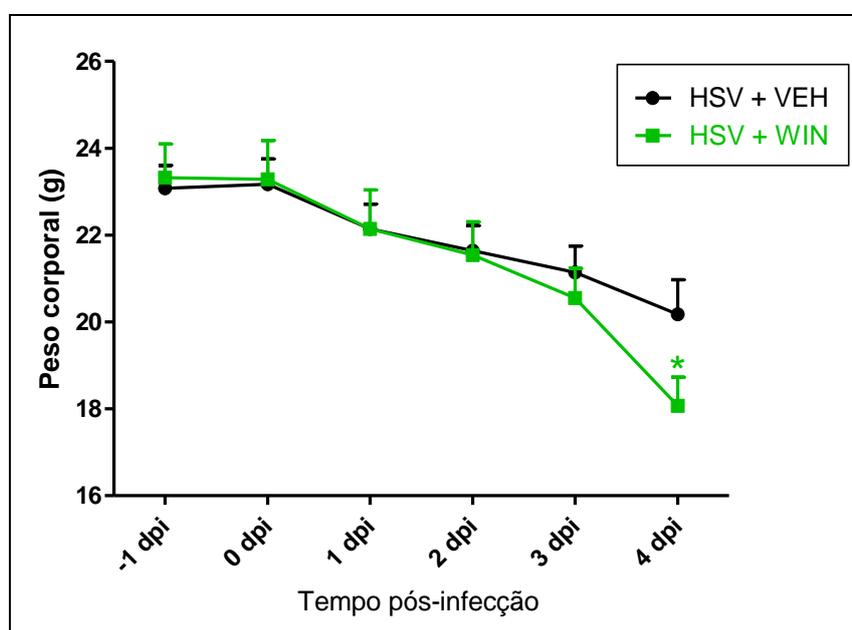


Figura 8. Perda de massa ponderal mensurada no grupo de camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=12) em comparação ao grupo de camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=11). O gráfico representa o peso médio (em gramas) de cada grupo experimental, registrado diariamente de -1 dpi a 4 dpi. Para o cálculo da percentagem média de perda de peso, utilizou-se a seguinte fórmula: $\left[100 - \left(\frac{\text{peso registrado no 4º dpi}}{\text{peso inicial}} \times 100 \right) \right]$. Teste t de Student comparando os dois grupos no 4 dpi, t=2.010, df=21, *p=0.057

Os animais designados à curva de sobrevida foram monitorados diariamente desde o dia -1 pós-infecção, utilizando-se a bateria SHIRPA. As análises de variância foram realizadas com pós-teste de Dunnett, tomando-se como base o desempenho obtido no -1 dpi. O grupo infectado que recebeu veículo (HSV+VEH, n=8) começou a demonstrar alterações clínicas a partir do 4º dpi em todas as categorias funcionais analisadas pelo SHIRPA, enquanto que os animais infectados tratados com canabinoide (HSV+WIN, n=8) demonstraram alterações nos escores já a partir do 3º dpi nos parâmetros “Reflexo e função sensorial” e “Estado neuropsiquiátrico”, como mostram os gráficos a seguir. Nos demais parâmetros (comportamento motor, função autonômica, tônus muscular e força), tanto os animais infectados tratados quanto infectados não tratados obtiveram escores semelhantes, com queda brusca no desempenho a partir de 4 dpi. A comparação pelo teste t de Student do desempenho dos grupos HSV+VEH e HSV+WIN tomando apenas os dados obtidos no 4 dpi não resultou em diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados pelo SHIRPA.

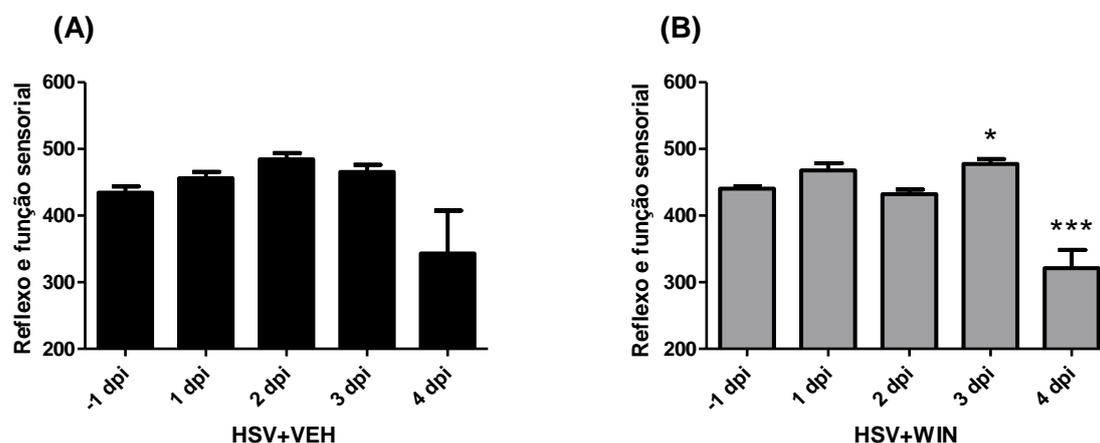


Figura 9. Comparação dos resultados obtidos na categoria *Reflexo e função sensorial* da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=8) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=8). Comparados aos animais não tratados (A), os animais infectados que receberam WIN55,212-2 (B) exibiram alterações precoces nos reflexos e nas funções sensoriais avaliadas pelo SHIRPA. ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

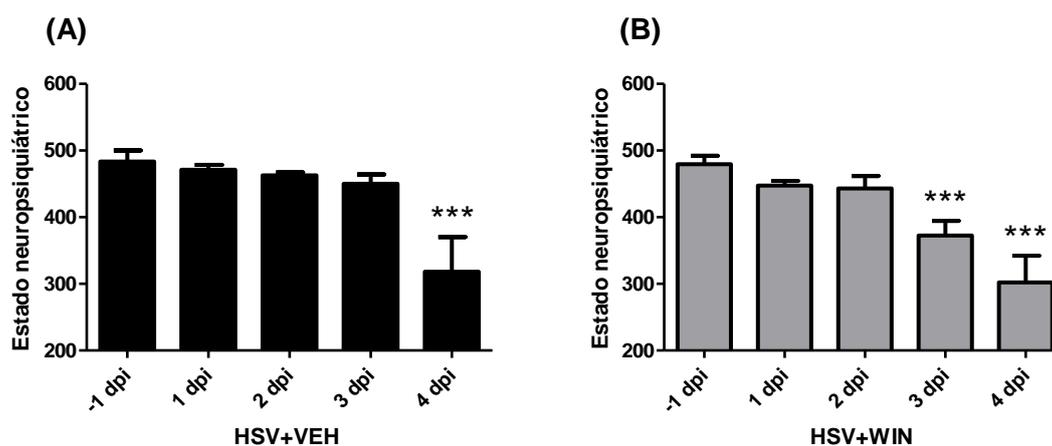


Figura 10. Comparação dos resultados obtidos na categoria *Estado Neuropsiquiátrico* da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=8) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=8). Camundongos infectados que receberam tratamento com WIN55,212-2 (B) tiveram um declínio acentuado dos escores na categoria *Estado neuropsiquiátrico*, culminando em diferença significativa já a partir do 3 dpi, enquanto que os animais infectados não tratados (A) apenas demonstraram declínio em performance a partir do 4^o dpi. ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. ***p<0,001

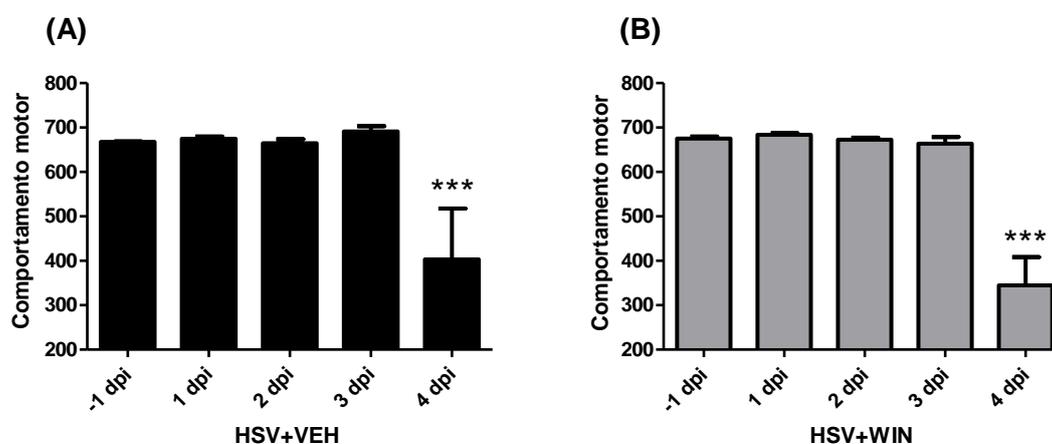


Figura 11. Comparação dos resultados obtidos na categoria *Comportamento motor* da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=8) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=8). Ambos os grupos tiveram declínio significativo nos resultados de comportamento motor a partir de 4 dpi. ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. ***p<0,001

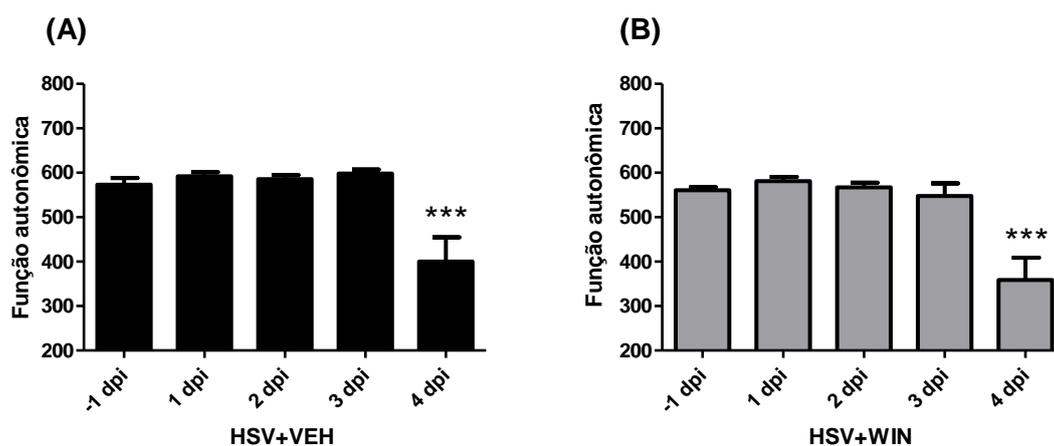


Figura 12. Comparação dos resultados obtidos na categoria *Função autonômica* da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=8) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=8). A função autonômica dos animais se manteve constante até o 3^o dpi e, 24h após, os camundongos apresentaram déficits nos testes que compõem este eixo funcional. ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. ***p<0,001

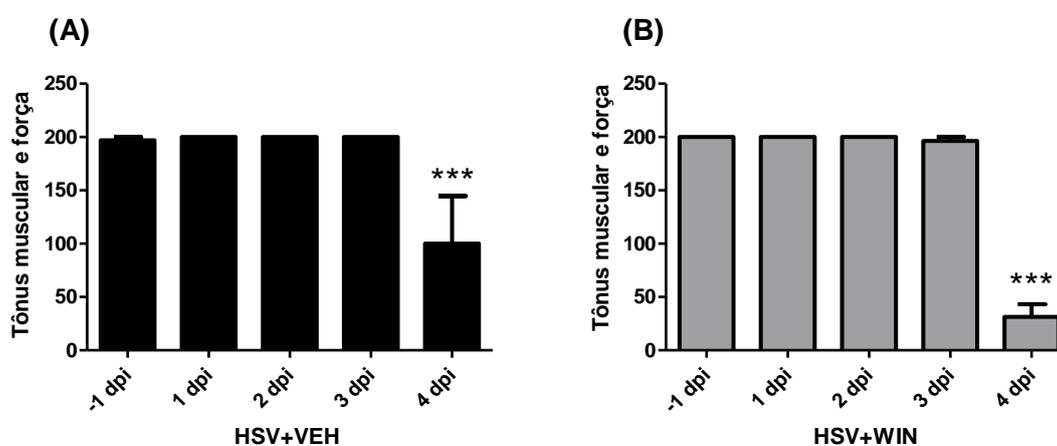


Figura 13. Comparação dos resultados obtidos na categoria *Tônus muscular e força* da bateria SHIRPA entre camundongos infectados tratados (HSV+WIN, n=8) e camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=8). Foram encontradas alterações perceptíveis em ambos os grupos apenas a partir do 4^o dpi. ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. ***p<0,001

5.3 Alterações comportamentais específicas

Foram encontradas alterações comportamentais no modelo preditivo de ansiedade em roedores, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Camundongos infectados HSV+VEH gastaram maior percentagem de tempo nos braços abertos ($71,5 \pm 8,58$; $n=12$) em comparação aos animais controles CTRL+VEH ($48,77 \pm 6,5$; $n=13$) (Teste t de Student; $p=0,0439$; $t=2.133$; $df=23$), enquanto que os animais infectados tratados HSV+WIN ($60,24 \pm 6,89$; $n=11$) não diferiram dos controles e nem do grupo HSV+VEH quanto ao tempo de exploração dos braços abertos. O grupo HSV+VEH também apresentou maior percentagem de entradas nos braços abertos ($76,12 \pm 8,14$; $n=12$) em relação ao grupo tratado (HSV+WIN, $55,75 \pm 3,61$; $n=11$; Teste t de Student, $p=0,0379$; $t=2.215$; $df=21$).

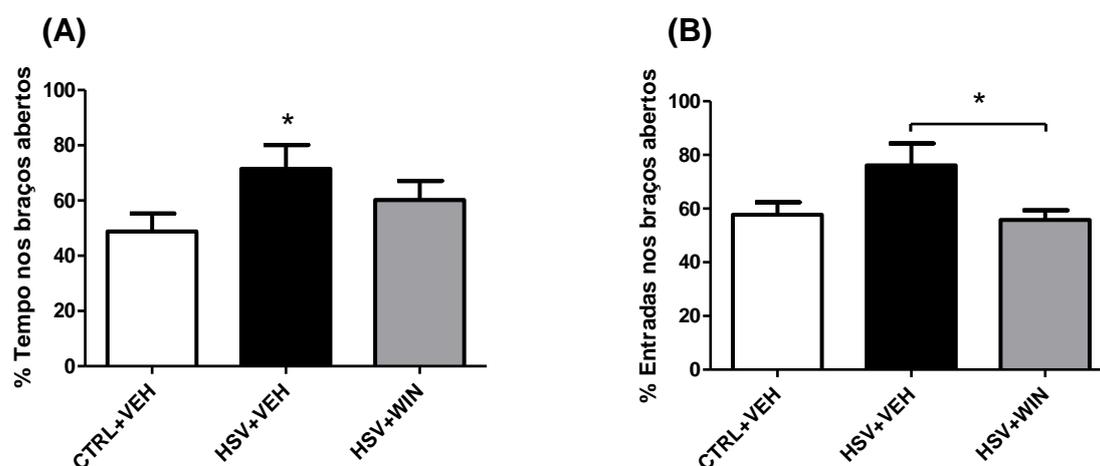


Figura 14. Avaliação do comportamento tipo ansioso exibido no Labirinto em Cruz Elevado por camundongos controles não infectados não tratados (CTRL+VEH), infectados tratados (HSV+WIN) e infectados não tratados (HSV+VEH). Os dados sugerem que camundongos HSV+VEH ($n=12$) apresentam um fenótipo comportamental menos ansioso, detectável no 2º dpi, enquanto que animais infectados que receberam WIN55,212-2 (HSV+WIN, $n=11$) têm desempenho mais aproximado ao grupo controle (CTRL+VEH $n=13$). Comparando-se a percentagem de entradas nos braços abertos, os animais infectados não tratados frequentaram mais a porção aberta do LCE em relação ao grupo HSV+WIN. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$.

No SRT, os animais infectados exibiram déficits pronunciados na capacidade de reconhecer outros indivíduos. Animais infectados não tratados foram capazes de discernir o indivíduo desconhecido do indivíduo ao qual foram expostos anteriormente no segundo contato (ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni, $p=0,0264$), enquanto que a taxa de interação social dos animais infectados tratados se manteve constante, um indicativo de que não houve aquisição de memória social.

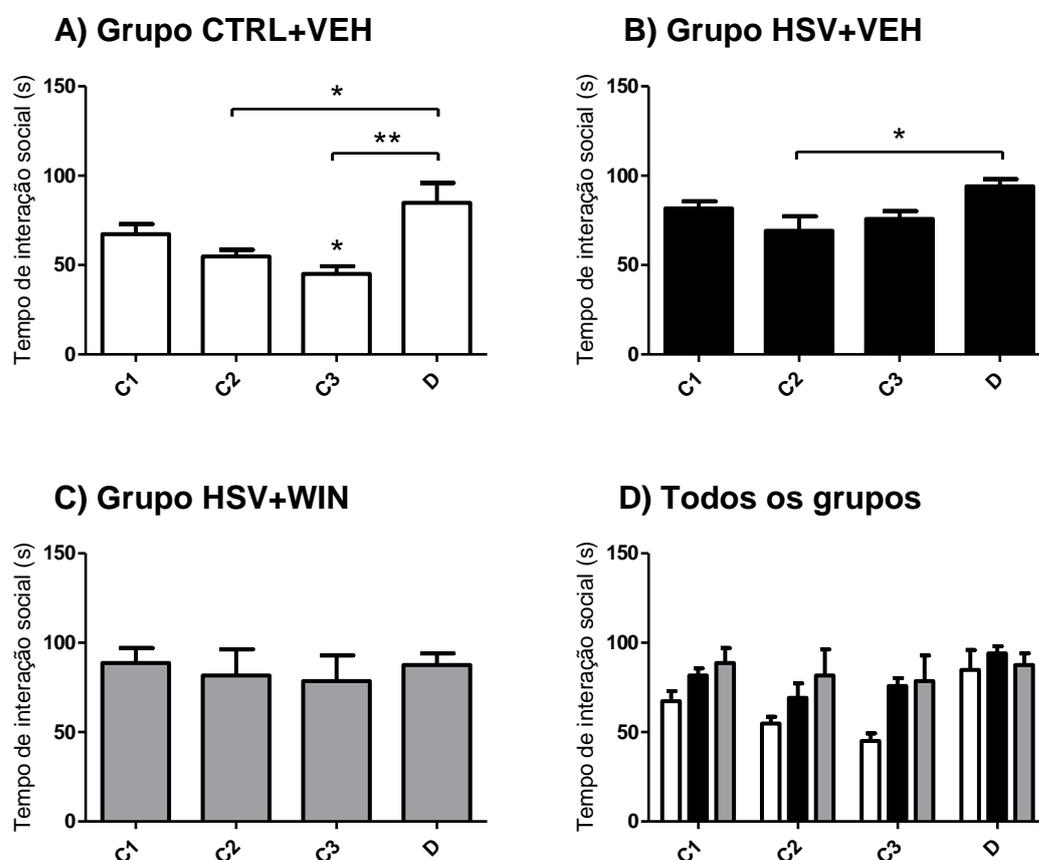


Figura 15. Avaliação da memória de reconhecimento social em camundongos controles não infectados não tratados (CTRL+VEH, $n=6$), camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, $n=6$) e camundongos infectados tratados (HSV+WIN, $n=6$). Foram detectados déficits na memória social de curto prazo em camundongos infectados (B), causados pelo HSV. O tratamento com WIN55,212-2 parece ter impedido a formação de qualquer memória social (C). ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Na tarefa da Esquiva inibitória, os resultados não apontam diferenças entre os grupos experimentais.

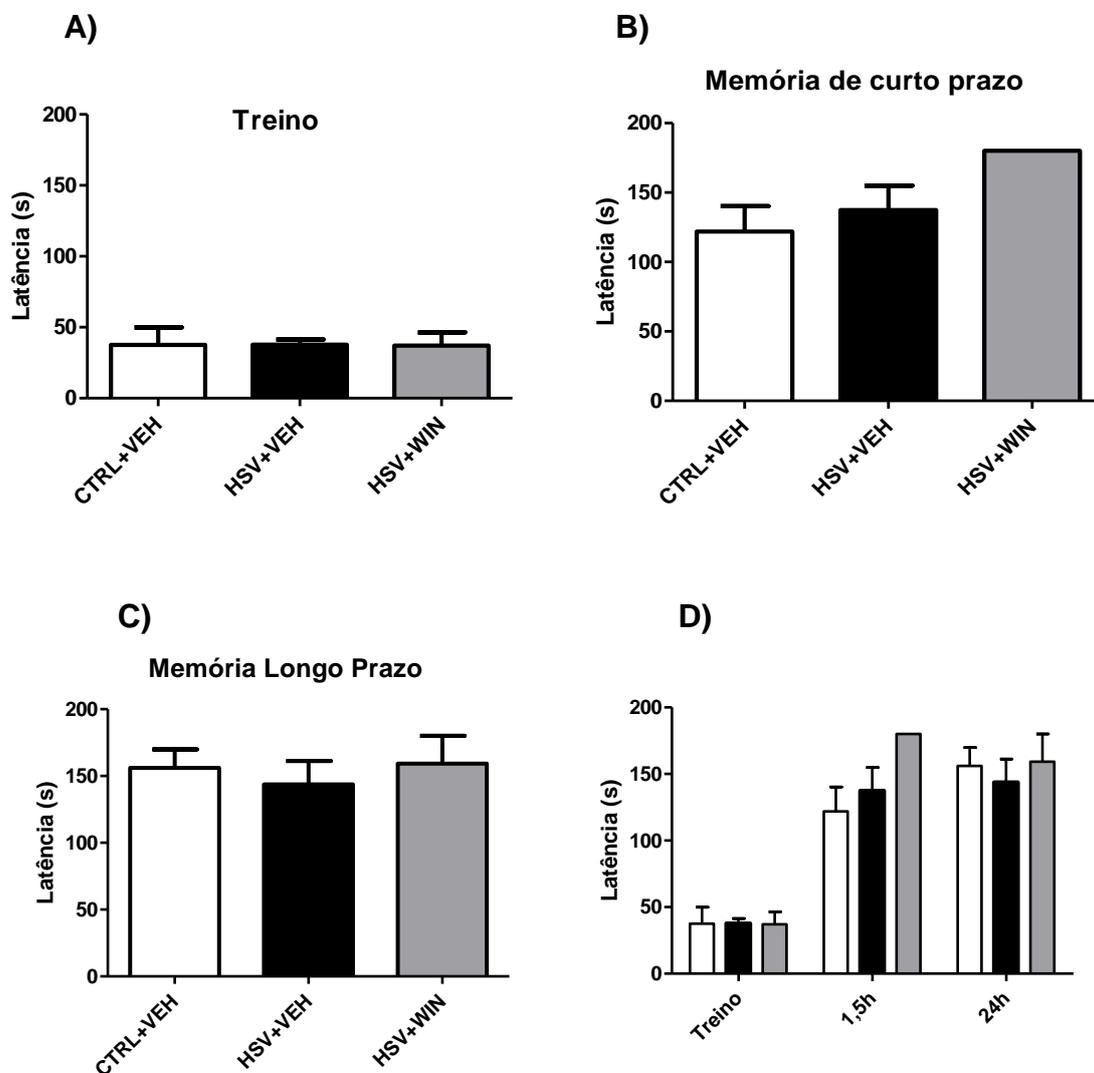


Figura 16. Resultados obtidos por camundongos controles não infectados não tratados CTRL+VEH (n=14), camundongos infectados não tratados HSV+VEH (n=14) e camundongos infectados tratados HSV+WIN (n=6) no Teste de Esquiva Inibitória. Nenhuma diferença entre grupos foi encontrada nas etapas de treino da tarefa aversiva, memória de curto prazo (reexposição à tarefa 1h30min após treino) e memória de longo prazo (reexposição à tarefa 24h após treino). ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

5.4 Dosagem das citocinas IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ

Os resultados mostram os níveis de citocinas dosadas no 4^o dpi em camundongos não infectados e não tratados (CTRL+VEH, barra branca), não infectados tratados (CTRL+WIN, barra quadriculada), infectados não tratados (HSV+VEH, barra preta) e infectados tratados (HSV+WIN). As citocinas IL-1 β e TNF- α foram encontradas em maior quantidade no cérebro de camundongos infectados, tratados e não tratados. Os níveis de IL-10 e IFN- γ não apresentaram diferenças entre os grupos. O efeito do tratamento com WIN55,212-2 em animais sadios também não surtiu diferenças na expressão destas citocinas.

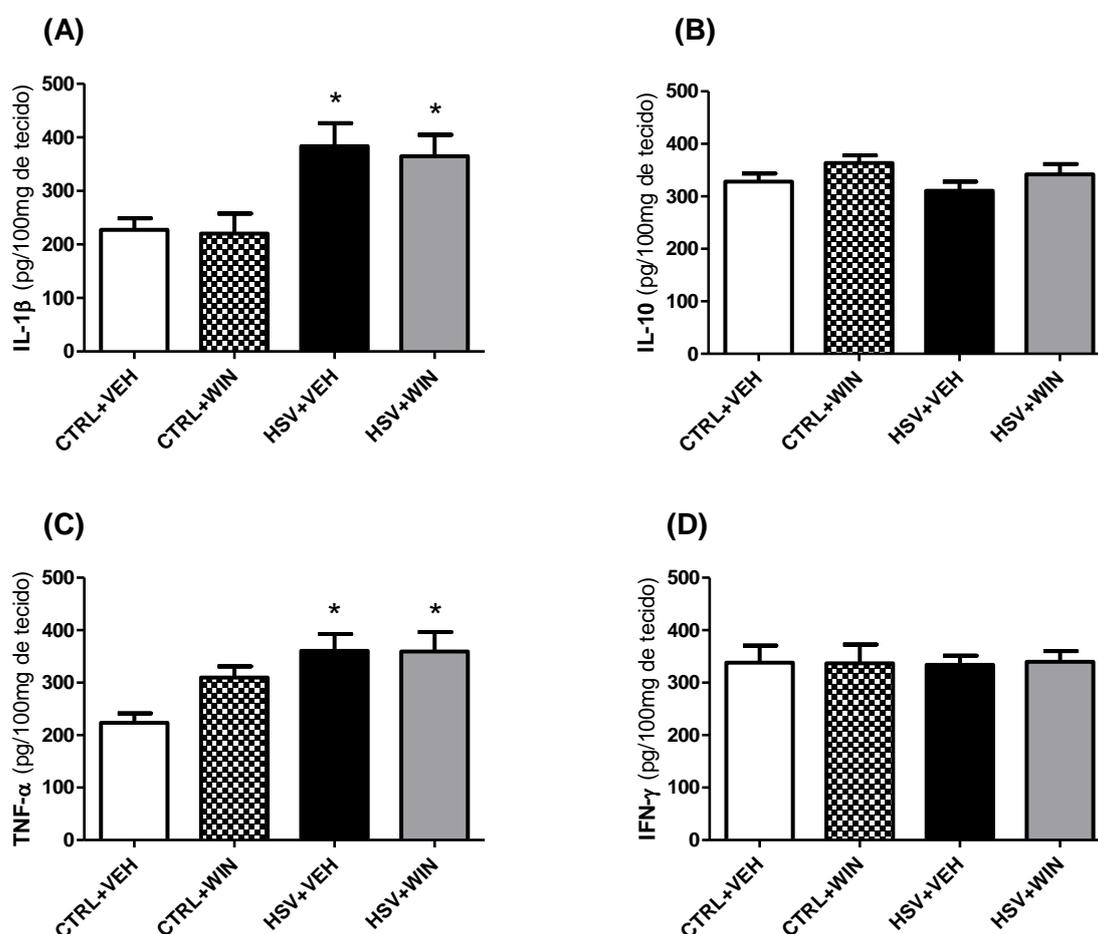


Figura 17. Resultado da dosagem de citocinas no sobrenadante de homogenatos de cérebros de camundongos controles não infectados não tratados (CTRL+VEH, n=12), camundongos não infectados tratados com WIN55,212-2 (CTRL+WIN, n=6), camundongos infectados não tratados (HSV+VEH, n=10) e animais infectados tratados com WIN55,212-2 (HSV+WIN, n=11). (A) Níveis de IL-1 β aumentados em animais infectados independente do tratamento, em relação ao grupo controle. (B)

Níveis de IL-10 inalterados entre grupos. (C) Níveis de TNF- α aumentados em camundongos infectados, indiferente do tratamento. (D) Níveis de IFN- γ inalterado entre grupos. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

5.5 Morte neuronal no hipocampo

A análise microscópica revelou perda neuronal significativa no hipocampo dos camundongos infectados, tanto no grupo não tratado ($13,11 \pm 1,51$; $n=5$) quanto no grupo tratado com WIN55,212-2 ($11,68 \pm 0,76$; $n=4$), comparando-se ao grupo controle não infectado e não tratado ($6,94 \pm 1,56$; $n=4$). A contagem das células foi realizada manualmente, como descrito na seção 4.11.

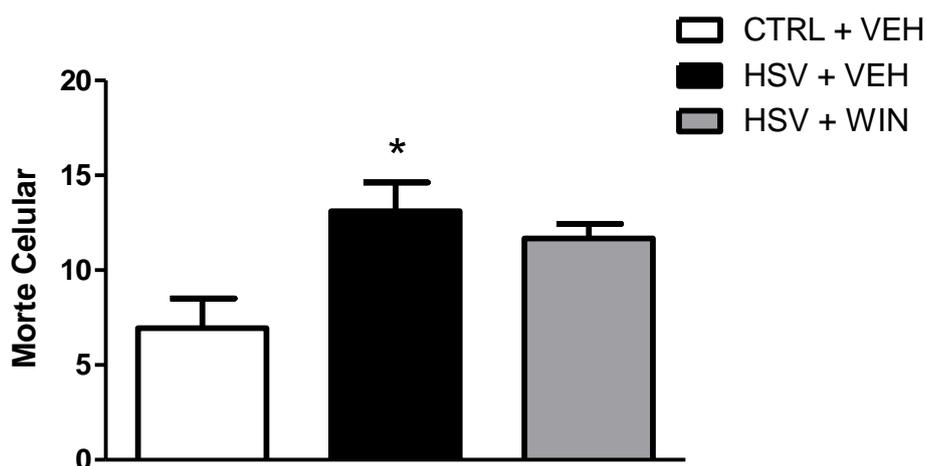


Figura 18. Quantificação da morte celular no hipocampo de camundongos infectados não tratados (barra preta, HSV+VEH, $n=5$) *versus* camundongos infectados tratados (barra cinza, HSV+WIN, $n=4$), em relação ao grupo controle (barra branca, CTRL+VEH, $n=4$). O gráfico mostra maior número de células mortas presentes no hipocampo de animais HSV+VEH em comparação ao grupo CTRL+VEH. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

5.6 Análise histopatológica

Não foram observadas alterações histopatológicas significativas entre os animais não infectados tratados (CTRL+WIN) ou não tratados com canabinoide (CTRL+VEH), sugerindo que o tratamento com WIN55,212-2 *per se* não altera nenhum aspecto histológico no cérebro de animais saudáveis. Já os animais infectados com HSV-1 10^2 PFU apresentaram meningoencefalite, caracterizada pela infiltração de células mononucleares nas meninges e no parênquima nervoso. O processo inflamatório foi detectado em diferentes áreas do encéfalo (cérebro, tronco encefálico e hipocampo) tanto nos animais infectados (HSV+VEH) quanto nos animais infectados tratados (HSV+WIN). Neurônios picnóticos e infiltração de células imunes foram observados nas regiões CA1-CA3 do hipocampo de ambos os grupos de animais infectados (Figuras 19 e 20).

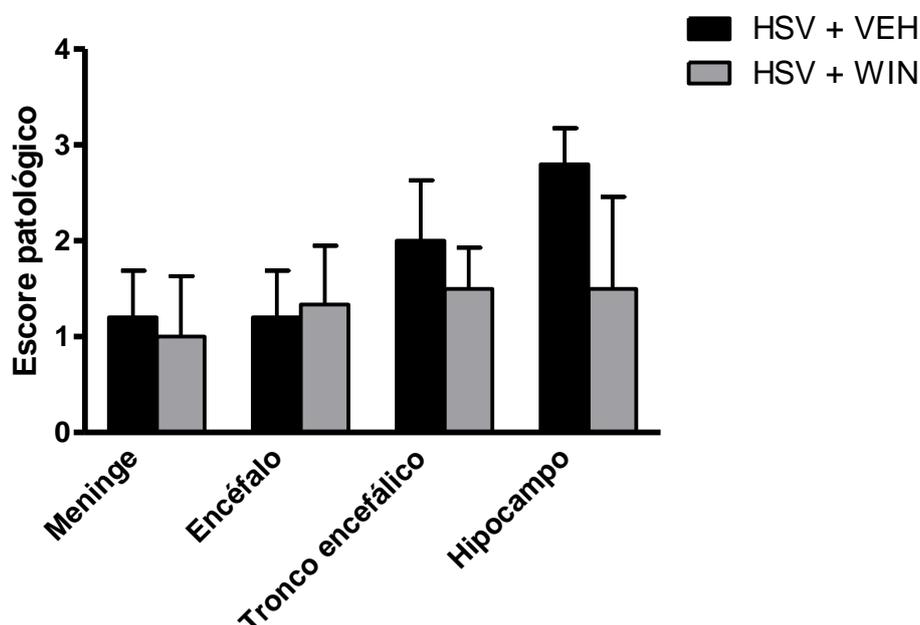


Figura 19. Análise histopatológica de diferentes áreas cerebrais de camundongo infectados não tratados (HSV+VEH, n=5) em comparação ao grupo de camundongos infectados tratados com canabinoide (HSV+WIN, n=6). Os resultados da análise histopatológica apontam o hipocampo como área mais afetada, dentre as estruturas investigadas, durante o processo inflamatório causado pela HSE. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

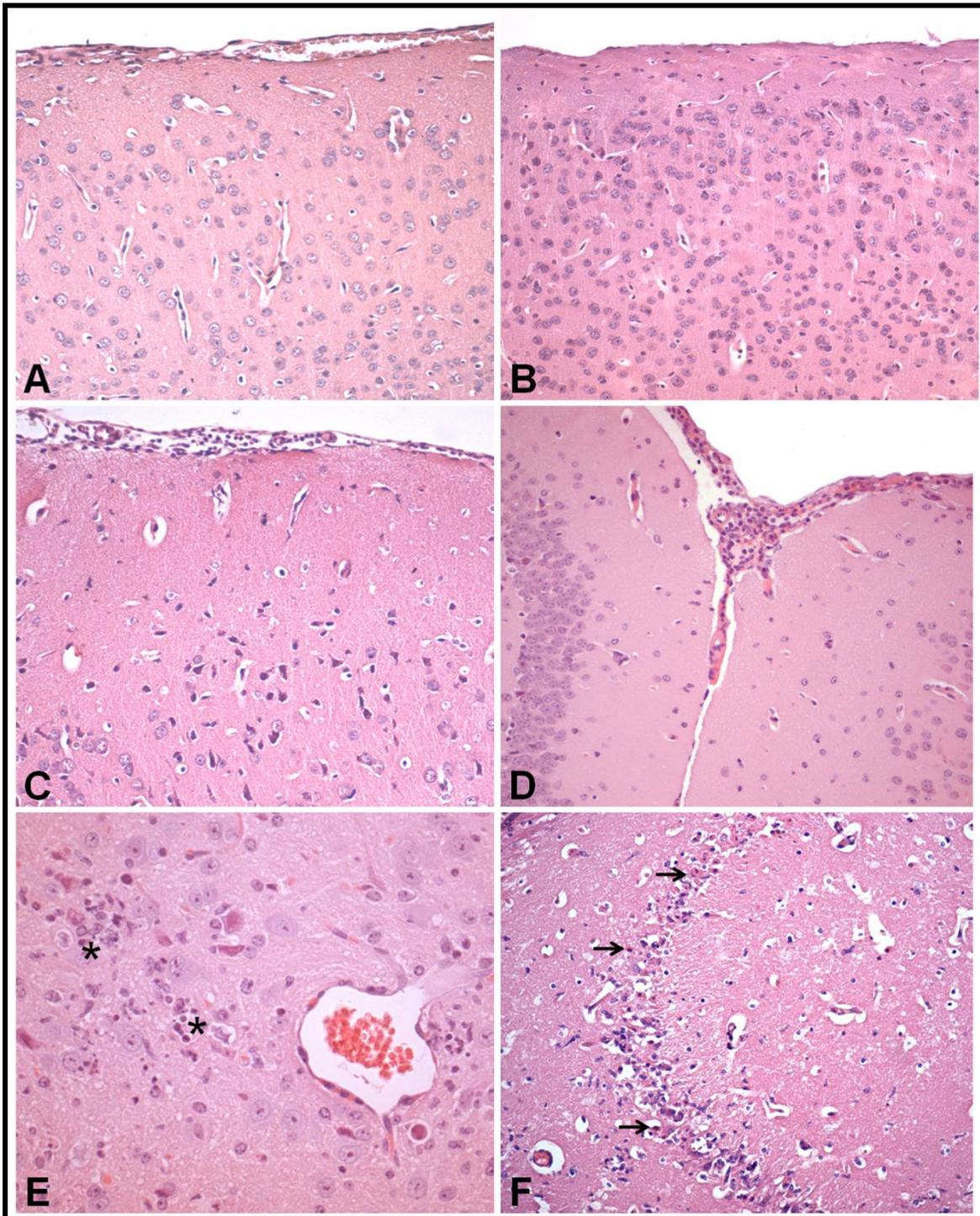


Figura 20. Fotomicrografias do encéfalo de camundongos C57BL/6 infectados com 10^2 PFU do vírus HSV-1 por via intracraniana, 4 dias após a infecção. A) Aspecto histológico normal do cérebro de camundongos não infectados e não tratados (CTRL+VEH); B) Animais não infectados tratados com WIN (CTRL+WIN). C) e D) Infiltrado inflamatório de células mononucleares nas meninges do cérebro nos animais HSV+VEH e nos animais HSV+WIN, respectivamente. E) Animais HSV+VEH: Presença de células imunes (asteriscos) no parênquima e tronco encefálico (encefalite). F) HSV+WIN: Destruição neuronal acentuada (setas) associada à infiltração de células inflamatórias, região CA2 do hipocampo. A-D: x200. E-F: x400.

6. DISCUSSÃO

O modelo de HSE por inoculação intracerebral de vírus tem se estabelecido como um modelo homólogo para o estudo dos mecanismos imunes envolvidos na infecção por HSV-1. Optou-se pelo inóculo viral de 10^2 PFU de acordo com estudos prévios do grupo (Vilela *et al.*, 2008; Vilela *et al.*, 2009; Vilela *et al.*, 2010) em que esta carga viral se mostrou adequada quanto aos parâmetros de neurovirulência e reprodutibilidade do modelo.

Neste estudo, utilizou-se uma ferramenta farmacológica com o intuito de investigar o papel do sistema endocanabinoide na modulação de respostas inflamatórias resultantes da encefalite herpética, induzida em camundongos selvagens C57BL/6 pela inoculação intracranial do vírus HSV-1. Uma característica importante do uso de canabinoides em modelos animais é o efeito sobre o comportamento. Em roedores, as drogas canabinoides produzem uma tétrede de efeitos farmacológicos, isto é, hipotermia, antinocicepção, hipolocomoção e catalepsia, observáveis em função da dose. Para minimizar o impacto causado por esses efeitos, a dose de canabinoide foi cuidadosamente escolhida e o comportamento do animal foi monitorado com o auxílio de distintas provas comportamentais, realizadas sempre antes da administração do fármaco.

Os resultados obtidos demonstram que canabinoides participam do processo inflamatório envolvido na encefalite herpética; contudo, agravando parte dos sinais clínicos. O tratamento subcrônico com 1 mg/kg do agonista não-seletivo WIN55,212-2 resultou em antecipação da mortalidade de animais infectados, maior perda de massa corporal, aparecimento precoce de alterações clínicas – relacionadas aos reflexos, funções sensoriais e estado neuropsiquiátrico – além de prejuízos na memória social. Os níveis de citocinas e a perda celular e tecidual não sofreram influência do tratamento entre os grupos de animais infectados. Particularmente no Labirinto em Cruz Elevado, um paradigma preditivo de comportamento ansioso, o tratamento com WIN55,212-2 pareceu conter a ansiólise exibida pelos animais infectados.

A dose de WIN55,212-2 adotada nos experimentos (1 mg/kg) foi escolhida com base em trabalhos que investigaram o papel modulador desta

droga sobre a inflamação (Marchalant *et al.*, 2007) e do impacto dessa droga sobre o desempenho comportamental em modelos animais. Já está bem descrito na literatura que doses acima de 1 mg/kg afetam o desempenho motor e cognitivo de roedores em modelos preditivos de comportamentos (Pamplona & Takahashi, 2006; Bambico *et al.*, 2007; Baek *et al.*, 2009). Uma das etapas do presente estudo objetivou avaliar os parâmetros comportamentais de memória e ansiedade em animais infectados tratados e não-tratados em função do curso da encefalite herpética, com a mínima interferência do fenômeno conhecido como dependência de estado (*state dependency*), em que estados neuro-humorais diferentes em cada fase da testagem comportamental alteram a aquisição e evocação de comportamentos, vinculando-os ao estado apresentado pelo animal em um ou outro momento. Sendo assim, o delineamento experimental foi definido de forma que toda a avaliação física e cognitiva dos animais se concentrasse na fase clara do ciclo circadiano, e a administração da droga encerrava a sessão experimental diária, ocorrendo no início da noite. Com esta medida, esperou-se minimizar os efeitos psicotrópicos da droga e salientar as alterações comportamentais derivadas da doença.

Em experimento inicial, a curva de sobrevivência teve por objetivo prover informações acerca da neurovirulência do inóculo de 10^2 PFU do vírus HSV-1 em animais C57BL/6 não tratados em relação aos animais tratados com WIN55,212-2. Apesar de a diferença não ter sido estatisticamente significativa entre as curvas, a mortalidade total do grupo de animais tratados foi atingida no 6º dia pós-infecção e diferiu daquela demonstrada pelos animais do grupo não tratado que conseguiram estender a sobrevivência até o 10º dpi. Este dado, tomado em conjunto com a perda ponderal também exibida pelos animais tratados nos quatro primeiros dias após a infecção, sugere que animais tratados com o canabinoide WIN55,212-2 têm um pior prognóstico para a encefalite herpética do que os animais infectados sem tratamento algum. Interessantemente, o WIN55,212-2, um agonista de receptores CB₁ cuja função biológica está ligada ao aumento do apetite (Merroun *et al.*, 2009), não exerceu este efeito particular neste modelo animal de HSE. Especula-se se a perda ponderal nesses animais possa ser resultante da diminuição da ingestão de ração ou mesmo da capacidade de alimentar-se.

No mesmo experimento inicial, utilizou-se a bateria SHIRPA, uma importante ferramenta diagnóstica que acompanhou a evolução da doença nos animais. Na categoria *Reflexo e Função sensorial*, os animais HSV+WIN apresentaram maior escore no 3º dia pós-infecção, em comparação ao nível basal (-1 dpi). A drástica queda de desempenho nestes testes no 4º dia sugere que os animais tratados desenvolvem a hiperreflexia e hipersensibilidade como sintomas precoces da doença. A observação mais proeminente obtida através do SHIRPA encontra-se na categoria *Estado Neuropsiquiátrico*. Nos animais infectados não tratados, o declínio nesta função é gradual, atingindo significância estatística no 4º dpi. Contudo, os animais infectados tratados demonstraram déficits já no 3º dpi. A execução e interpretação do SHIRPA devem ser realizadas por experimentador treinado e é imprescindível levar em conta a configuração experimental. Nos estágios finais da HSE, a perda ponderal é acentuada e pode impactar os resultados de tônus abdominal e corporal. Além disso, uma característica marcante no desenvolvimento da doença é a ataxia, notada pelo arrastamento de um ou dos dois membros posteriores do animal. Nesta fase, que em nossos estudos se iniciou por volta do 4º dpi, todas as categorias foram afetadas e os animais obtiveram piores escores no SHIRPA. Sendo este um modelo agudo de infecção, alterações drásticas podem ocorrer em um período de 24 h. Animais que apresentam sinais clínicos leves podem vir a óbito no dia seguinte, bem como animais que já apresentam sinais avançados da doença podem sobreviver por um período maior. Esta configuração experimental, em parte, justifica o elevado erro padrão da média dos grupos. Mesmo sendo considerada uma bateria de avaliação do estado geral dos animais, o SHIRPA revelou alterações desde o 3º dia pós-infecção em duas das cinco categorias funcionais avaliadas, mais uma vez corroborando o pior desempenho dos animais tratados com canabinoide em relação aos animais não tratados.

Desta forma, as informações obtidas pelo SHIRPA sobre o aparecimento de sinais clínicos foram de suma importância na etapa seguinte da pesquisa. Foi elaborado um desenho experimental abrangente de testes comportamentais levando-se em consideração: a) dados da literatura, que apontam a maior destruição tecidual nas regiões fronto-temporais e límbicas devido ao neurotropismo do HSV-1 (Baringer, 2008); b) dados obtidos pelo

SHIRPA, em que a manifestação de sintomas no 3º dpi indicou que qualquer manipulação experimental dos animais deveria ser realizada previamente, nos dias 1 e 2 pós-infecção, e c) conhecimento sobre os testes comportamentais escolhidos (LCE / SRT / Esquiva Inibitória).

De acordo com os resultados do LCE, realizado no 2º dpi, os animais infectados não tratados (HSV+VEH) exibiram um fenótipo menos ansioso, demonstrado por maior tempo e frequência de exploração dos braços abertos. O comportamento dos animais HSV+WIN esteve mais próximo dos animais CTRL+VEH, sugerindo que o tratamento com canabinoide atenuou o comportamento aberrante causado pela doença nos animais não tratados. É possível que o comportamento dos animais HSV+VEH tenha sido causado pelo início da perda neuronal no hipocampo ou da destruição específica de vias responsáveis por este comportamento.

O SRT contribuiu para a caracterização fenotípica dos animais afetados pela HSE. Adaptações ao protocolo do teste foram necessárias para adequação ao modelo experimental da HSE e por esta razão o SRT forneceu dados relacionados à memória social de curto prazo dos animais. Esta tarefa não-condicionada é baseada no impulso inato de um animal adulto em investigar outro de mesma espécie, de forma que nenhum fator adicional é envolvido (punição ou reforço) (Engelmann, 2009). O estímulo olfatório é a principal fonte de aquisição de memória neste teste, sendo de alta relevância etológica, visto que o olfato fornece pistas vitais sobre o ambiente para os camundongos (Richter *et al.*, 2005). Os resultados permitem a comparação do desempenho do animal tendo por base seu próprio rendimento basal, para uma análise estatística mais apropriada. Este teste também revelou pior desempenho mnemônico dos animais tratados com WIN55,212-2. Sabe-se que o bulbo olfatório é uma das regiões para a qual o HSV-1 apresenta maior neurotropismo, além do hipocampo e outras áreas temporais (Rozenberg *et al.*, 2011). Portanto, já se esperava que devido à infecção viral, a destruição de neurônios no bulbo olfatório e hipocampo resultasse em algum grau de perda da capacidade de adquirir e manter a memória social. Isto foi confirmado no resultado dos camundongos HSV+VEH, que investigaram mais o animal desconhecido do que o animal ao qual foram expostos repetidamente (na 2ª exposição), o que sugere a diminuição na capacidade de reter a memória

social, embora ainda sejam parcialmente capazes de adquirir a memória. Os animais HSV+WIN, em contrapartida, tiveram o mesmo índice de exploração do intruso nas três exposições consecutivas e não foram capazes de discernir entre o animal conhecido e o animal desconhecido na última sessão. Um teste para detectar anosmia seria complementar aos resultados obtidos no SRT, para investigar se o efeito obtido foi causado por perda da capacidade mnemônica ou do olfato.

Sem revelar diferenças significativas entre grupos, o teste da Esquiva Inibitória pode ser alvo de duas importantes considerações: o protocolo experimental necessita de dois dias para a realização do teste, que foram estabelecidos nos dias 1 e 2 pós-infecção. O modelo de HSE tem uma evolução muito rápida dentro do período de 24h, de maneira que o animal pode apresentar-se assintomático em um dia e ter uma piora clínica drástica no dia seguinte. Em modelos de inflamação como a HSE, em que a doença evolui rapidamente, é preferível utilizar protocolos experimentais que durem menos de 24h. Outra consideração sobre o uso deste paradigma comportamental é a existência do estímulo aversivo (choque), acionado como reforço negativo no teste da Esquiva Inibitória, pois isto impõe a dificuldade em dissociar as áreas cerebrais envolvidas na associação do estímulo daquelas vias que são essencialmente implicadas no processamento emocional de estímulos condicionados e não-condicionados (Richter *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que os testes comportamentais (LCE / Esquiva inibitória / SRT) foram realizados nos dias 1 e 2 dpi e revelaram alterações que não foram apreendidas pelo SHIRPA. A integração de dados obtidos pelo SHIRPA e pela bateria de testes comportamentais específicos proporcionou planejamento experimental mais adequado, pois salientou as vantagens e desvantagens de cada modelo de avaliação e foi mais sensível ao aparecimento de sintomas em sequência temporal. A inclusão de testes comportamentais específicos no modelo de encefalite herpética trouxe um avanço em pesquisas que utilizam este modelo, no sentido de aumentar a sensibilidade e fidedignidade do modelo animal em relação ao quadro clínico humano. As alterações comportamentais visíveis desde o 2º dia após a infecção não foram detectáveis por outros meios e precederam os sinais físicos da doença. Outra grande contribuição desta etapa da pesquisa esteve relacionada ao uso de canabinoide. Embora os

animais não estivessem sob efeito imediato da injeção de WIN55,212-2, é possível que o uso subcrônico da droga tenha interferido nos resultados comportamentais. O estudo da memória engloba diversos fatores como a natureza da tarefa, as áreas cerebrais envolvidas e os estágios da formação de memórias, e é possível que o tratamento com canabinoide tenha interferido em todas essas variáveis (Bambico *et al.*, 2009; Marsicano & Lafenetre, 2009). Neste caso, a inclusão de mais um grupo experimental não infectado e tratado (CTRL+WIN) forneceria dados acerca desta possível influência do tratamento *per se* sobre o comportamento, embora outros autores já tenham discutido o efeito do WIN55,212-2 sobre a memória (Pamplona & Takahashi, 2006; Baek *et al.*, 2009; Marsicano & Lafenetre, 2009; Nasehi *et al.*, 2010) e ansiedade (Patel & Hillard, 2006; Rutkowska *et al.*, 2006) em modelos animais.

Verificou-se que os níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α no 4^o dpi estavam aumentados, tanto em animais infectados tratados quanto nos animais não tratados. O controle da infecção por HSV-1 é realizado por um conjunto de respostas imunológicas que incluem a expressão de citocinas, recrutamento de leucócitos – incluindo as células NK – e a indução de respostas antígeno-específicas por parte de células T (Vilela *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que o TNF- α é capaz de proteger animais C57BL/6 da encefalite herpética quando o vírus é inoculado periféricamente (Vilela *et al.*, 2010), e que é possível detectar níveis elevados de TNF- α em cérebros de camundongos infectados intracranialmente pelo HSV-1 já no 3^o dia pós-infecção (Vilela *et al.*, 2008), de forma que os resultados encontrados nesta pesquisa endossam resultados prévios descritos na literatura. A ação anti-inflamatória do WIN55,212-2 é associada à redução da capacidade de diferenciação das células T CD4⁺ naíve em células efectoras de perfil Th1 (Croxford & Miller, 2003), que produzem, por sua vez, as citocinas IFN γ e TNF- α . Contudo, uma vez que os resultados da dosagem de IFN γ e TNF- α não diferiram entre animais tratados e não tratados, propõe-se que o WIN55,212-2 neste modelo não atuou de forma significativa sobre as células imunes ou sobre a produção de citocinas, e sim por outros mecanismos, possivelmente pela inibição da via de sinalização de NO.

Já foi demonstrado por Sheng *et al.* (2005) que o WIN55,212-2 é capaz de inibir a NO sintase induzível (iNOS) e assim reduzir a produção de NO por astrócitos estimulados pela IL-1. Herrera *et al.* (2008) utilizou um vírus (vírus da

estomatite vesicular, VSV) cuja replicação é sensível aos efeitos antivirais do NO para demonstrar o efeito do tratamento *in vitro* de células neuronais com WIN55,212-2. A droga inibiu a síntese de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) de maneira Ca^{2+} -dependente e antagonizou a resposta antiviral do IFN- γ em controlar a replicação viral. Sendo assim, embora a sinalização por NO não tenha sido diretamente abordada nesta pesquisa, é possível inferir que os efeitos do WIN55,212-2 tenham sido frutos das alterações nesta via. Nos neurônios, o efeito antiviral do IFN- γ envolve o aumento da produção de NO pela síntese da enzima nNOS e que esta enzima é dependente de cálcio e calmodulina (Herrera *et al.*, 2008). Uma vez que uma das ações do WIN55,212-2 é limitar o nível de Ca^{2+} intracelular, um possível mecanismo pelo qual o WIN55,212-2 antagoniza o efeito antiviral do IFN- γ seria pela inibição da síntese de NO.

Os resultados do SRT reforçam esta hipótese dos efeitos do WIN55,212-2 serem mediados pela redução na produção de NO. O estudo de Kendrick *et al.* (1997) destacou o papel do NO sobre o aprendizado olfatório. Segundo os autores, a inibição da nNOS impede a potenciação da liberação de glutamato e a formação de memórias olfativas. Portanto, a incapacidade dos animais HSV+WIN de adquirir a memória social pode ter sido também um resultado da modulação negativa do WIN55,212-2 sobre as enzimas sintetizadoras de NO, impedindo a formação da memória olfativa necessária para a discriminação dos indivíduos no SRT. Neurotransmissores clássicos como o glutamato, que são modulados por canabinoides (Fernandez-Lopez *et al.*, 2006), também podem ter participação sobre as diferenças comportamentais exibidas pelos animais infectados tratados.

A morte neuronal no hipocampo, avaliada nos animais eutanasiados no 3º dpi, revelou-se semelhante nos grupos HSV+VEH e HSV+WIN. A perda neuronal associada à HSE é resultante da lise diretamente causada pela replicação viral e pela resposta imune citolítica (Rozenberg *et al.*, 2011). Isto indica que o tratamento com WIN55,212-2, na forma com que foi administrado neste estudo, não agiu controlando a replicação viral nem suprimindo a atividade citotóxica de linfócitos T.

Dentre as áreas observadas quanto a danos teciduais, o hipocampo recebeu escores mais altos, corroborando o dado da literatura que aponta o tropismo do vírus HSV-1 por esta região específica do cérebro. Não houve diferenças entre os grupos HSV+VEH e HSV+WIN. O tratamento com WIN55,212-2 somente, na ausência de processo patológico no cérebro, não causou perda tecidual relevante. As alterações comportamentais detectadas em animais infectados, independente do tratamento, podem em parte ser justificadas pela destruição específica do hipocampo, embora não pareça ser este o único fator determinante para as diferenças comportamentais entre animais tratados e não tratados. Como discutido anteriormente, tendo por base que a ativação farmacológica de receptores CB₁ altera a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos, esta ação pode ter contribuído para o fenótipo comportamental dos animais HSV+WIN.

Futuras perspectivas para este trabalho incluem a investigação da modulação da via de sinalização do NO pelo agonista canabinoide WIN55,212-2, que em última instância pode ter sido essencial no engendramento dos efeitos imunológicos e comportamentais obtidos nesta pesquisa. Outra questão a ser investigada é se o canabinoide WIN55,212-2 interferiu na replicação viral, visto que não foi realizada a titulação no tecido cerebral dos animais infectados. Além disso, uma abordagem farmacológica mais abrangente, com o uso de outros canabinoides neste mesmo modelo experimental de HSE, é recomendada, seguida de um estudo acerca de como canabinoides interferem na cinética da doença e na liberação de neurotransmissores. Seguindo a distribuição dos receptores canabinoides no cérebro, o estudo histológico de outras regiões encefálicas também pode elucidar outras formas de intervenção dos canabinoides na encefalite herpética e nos processos neuroinflamatórios. Por fim, a incorporação de outros testes comportamentais que podem ser sensíveis às alterações causadas pela encefalite herpética também são possibilidade a serem exploradas em estudos futuros, de forma a contribuir para o entendimento da patogênese da HSE.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu com a investigação da atividade da droga canabinoide WIN55,212-2 na modulação de respostas inflamatórias resultantes da encefalite herpética induzida em camundongos selvagens C57BL/6 pela inoculação intracranial do vírus HSV-1. Com base nos resultados desta pesquisa, conclui-se que:

- O tratamento com o agonista canabinoide WIN55,212-2 exerceu efeito deletério sobre o curso da HSE em camundongos da linhagem C57BL/6, acelerando a mortalidade e promovendo sintomas mais proeminentes da doença, embora não tenha influenciado diretamente os níveis de citocinas nem a perda celular e tecidual no cérebro dos camundongos.
- O processo inflamatório causado por inoculação intracranial de 10^2 PFU do vírus HSV-1 em camundongos, acarretou em alterações precoces de comportamento, com consequente perda neuronal e tecidual nos grupos tratados e não tratados. Camundongos infectados não tratados (HSV+VEH) apresentam déficits na memória social de curto prazo e um comportamento aberrante de desinibição em modelo preditivo da atividade ansiolítica. Camundongos infectados tratados (HSV+WIN) tiveram desempenho insatisfatório no teste de reconhecimento social e comportamento mais ansioso no labirinto em cruz elevado em comparação ao grupo HSV+VEH. Os sinais clínicos da encefalite herpética e as alterações comportamentais foram detectados logo no segundo dia pós-infecção com o uso de modelos animais mais sensíveis do que protocolos de avaliação generalizados.
- Os dados obtidos nos testes comportamentais de avaliação da memória e níveis de ansiedade foram condizentes com o dano tecidual nas regiões investigadas, isto é, no encéfalo, meninges, tronco encefálico e hipocampo. A acentuada perda neuronal no hipocampo, vista no 3º dpi, foi confirmada pelo prejuízo no desempenho dos camundongos quando expostos às tarefas hipocampo-dependentes no 2º dpi.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D. C., RACHID, M. A., *et al.* "Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice." **J Neuroinflammation** 8: 23, 2011.
- AMERI, A. "The effects of cannabinoids on the brain." **Prog Neurobiol** 58(4): 315-348, 1999.
- ARMIEN, A. G., HU, S., *et al.* "Chronic cortical and subcortical pathology with associated neurological deficits ensuing experimental herpes encephalitis." **Brain Pathol** 20(4): 738-750, 2010.
- ASHCRAFT, K. A., HUNZEKER, J., *et al.* "Psychological stress impairs the local CD8+ T cell response to mucosal HSV-1 infection and allows for increased pathogenicity via a glucocorticoid receptor-mediated mechanism." **Psychoneuroendocrinology** 33(7): 951-963, 2008.
- BAEK, J., ZHENG, Y., *et al.* "The CB1 receptor agonist, WIN 55,212-2, dose-dependently disrupts object recognition memory in adult rats." **Neurosci Lett** 464(1): 71-73, 2009.
- BAMBICO, F. R., DURANTI, A., *et al.* "Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models." **Curr Pharm Des** 15(14): 1623-1646, 2009.
- BAMBICO, F. R., KATZ, N., *et al.* "Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex." **J Neurosci** 27(43): 11700-11711, 2007.
- BARINGER, J. R. "Herpes simplex infections of the nervous system." **Neurol Clin** 26(3): 657-674, viii, 2008.
- BEGG, M., PACHER, P., *et al.* "Evidence for novel cannabinoid receptors." **Pharmacol Ther** 106(2): 133-145, 2005.
- BENAMAR, K., GELLER, E. B., *et al.* "First in vivo evidence for a functional interaction between chemokine and cannabinoid systems in the brain." **J Pharmacol Exp Ther** 325(2): 641-645, 2008.
- BENITO, C., TOLON, R. M., *et al.* "Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation." **Br J Pharmacol** 153(2): 277-285, 2008.
- BRITO, R. G. (2007). Papel dos receptores canabinóides em um modelo experimental de angiogênese inflamatória. [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte, UFMG: 142 fl.
- BURSTEIN, S. H. & ZURIER, R. B. "Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation." **AAPS J** 11(1): 109-119, 2009.
- CABRAL, G. A. & GRIFFIN-THOMAS, L. "Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation." **Expert Rev Mol Med** 11: e3, 2009.
- CABRAL, G. A., LOCKMULLER, J. C., *et al.* "Delta 9-tetrahydrocannabinol decreases alpha/beta interferon response to herpes simplex virus type 2 in the B6C3F1 mouse." **Proc Soc Exp Biol Med** 181(2): 305-311, 1986.
- CABRAL, G. A. & MARCIANO-CABRAL, F. "Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance." **J Leukoc Biol** 78(6): 1192-1197, 2005.
- COMPTON, D. R., GOLD, L. H., *et al.* "Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from

- delta 9-tetrahydrocannabinol." **J Pharmacol Exp Ther** 263(3): 1118-1126, 1992.
- CONRADY, C. D., DREVETS, D. A., *et al.* "Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing?" **J Neuroimmunol** 220(1-2): 1-9, 2010.
- CROXFORD, J. L.&MILLER, S. D. "Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212." **J Clin Invest** 111(8): 1231-1240, 2003.
- CROXFORD, J. L.&YAMAMURA, T. "Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases?" **J Neuroimmunol** 166(1-2): 3-18, 2005.
- DE PETROCELLIS, L.&DI MARZO, V. "An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts." **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 23(1): 1-15, 2009.
- DEVANE, W. A., DYSARZ, F. A., 3RD, *et al.* "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." **Mol Pharmacol** 34(5): 605-613, 1988.
- DI MARZO, V., DE PETROCELLIS, L., *et al.* "Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells." **Biochem J** 316 (Pt 3): 977-984, 1996.
- DONG-NEWSOM, P., POWELL, N. D., *et al.* "Repeated social stress enhances the innate immune response to a primary HSV-1 infection in the cornea and trigeminal ganglia of Balb/c mice." **Brain Behav Immun** 24(2): 273-280, 2010.
- DOWNER, E. J. "Cannabinoids and innate immunity: taking a toll on neuroinflammation." **ScientificWorldJournal** 11: 855-865, 2011.
- ELJASCHEWITSCH, E., WITTING, A., *et al.* "The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells." **Neuron** 49(1): 67-79, 2006.
- ENGELMANN, M. "Competition between two memory traces for long-term recognition memory." **Neurobiol Learn Mem** 91(1): 58-65, 2009.
- ESIRI, M. M. "Herpes simplex encephalitis. An immunohistological study of the distribution of viral antigen within the brain." **J Neurol Sci** 54(2): 209-226, 1982.
- FERNANDEZ-LOPEZ, D., MARTINEZ-ORGADO, J., *et al.* "Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats." **Pediatr Res** 60(2): 169-173, 2006.
- FREUND, T. F., KATONA, I., *et al.* "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling." **Physiol Rev** 83(3): 1017-1066, 2003.
- GALIEGUE, S., MARY, S., *et al.* "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." **Eur J Biochem** 232(1): 54-61, 1995.
- HATCHER, J. P., JONES, D. N., *et al.* "Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice." **Behav Brain Res** 125(1-2): 43-47, 2001.
- HAUWEL, M., FURON, E., *et al.* "Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells." **Brain Res Brain Res Rev** 48(2): 220-233, 2005.

- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., *et al.* "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study." **J Neurosci** 11(2): 563-583, 1991.
- HERRERA, R. A., OVED, J. H., *et al.* "Disruption of IFN-gamma- mediated antiviral activity in neurons: the role of cannabinoids." **Viral Immunol** 21(2): 141-152, 2008.
- HOWLETT, A. C. "The cannabinoid receptors." **Prostaglandins Other Lipid Mediat** 68-69: 619-631, 2002.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., *et al.* "Separate mechanisms for short- and long-term memory." **Behav Brain Res** 103(1): 1-11, 1999.
- JEAN-GILLES, L., GRAN, B., *et al.* "Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system." **Immunobiology** 215(8): 606-610, 2010.
- KASAHARA, M., GROENINK, L., *et al.* "Influence of transgenic corticotropin-releasing factor (CRF) over-expression on social recognition memory in mice." **Behav Brain Res**, 2010.
- KENDRICK, K. M., GUEVARA-GUZMAN, R., *et al.* "Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide." **Nature** 388(6643): 670-674, 1997.
- KLEIN, T. W. "Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics." **Nat Rev Immunol** 5(5): 400-411, 2005.
- KLEIN, T. W., NEWTON, C., *et al.* "The cannabinoid system and immune modulation." **J Leukoc Biol** 74(4): 486-496, 2003.
- KOMATSU, T., BI, Z., *et al.* "Interferon-gamma induced type I nitric oxide synthase activity inhibits viral replication in neurons." **J Neuroimmunol** 68(1-2): 101-108, 1996.
- KOPP, S. J., BANISADR, G., *et al.* "Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1." **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(42): 17916-17920, 2009.
- KU, C. C., CHE, X. B., *et al.* "Herpes simplex virus-1 induces expression of a novel MxA isoform that enhances viral replication." **Immunol Cell Biol** 89(2): 173-182, 2011.
- LACKNER, P., BEER, R., *et al.* "Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria." **Neuropathol Appl Neurobiol** 32(2): 177-188, 2006.
- LIU, T., KHANNA, K. M., *et al.* "CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons." **J Exp Med** 191(9): 1459-1466, 2000.
- LOANE, D. J. & BYRNES, K. R. "Role of microglia in neurotrauma." **Neurotherapeutics** 7(4): 366-377, 2010.
- MARCHALANT, Y., ROSI, S., *et al.* "Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist WIN-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation." **Neuroscience** 144(4): 1516-1522, 2007.
- MARSICANO, G. & LAFENETRE, P. "Roles of the endocannabinoid system in learning and memory." **Curr Top Behav Neurosci** 1: 201-230, 2009.
- MCLAUGHLIN, R. J., HILL, M. N., *et al.* "Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect." **Behav Pharmacol** 18(5-6): 431-438, 2007.

- MECHOULAM, R.&GAONI, Y. "A Total Synthesis of DI-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish." **J Am Chem Soc** 87: 3273-3275, 1965.
- MERROUN, I., ERRAMI, M., *et al.* "Influence of intracerebroventricular or intraperitoneal administration of cannabinoid receptor agonist (WIN 55,212-2) and inverse agonist (AM 251) on the regulation of food intake and hypothalamic serotonin levels." **Br J Nutr** 101(10): 1569-1578, 2009.
- NAGARKATTI, P., PANDEY, R., *et al.* "Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs." **Future Med Chem** 1(7): 1333-1349, 2009.
- NASEHI, M., PIRI, M., *et al.* "Influence of intracerebral administration of NO agents in dorsal hippocampus (CA1) on cannabinoid state-dependent memory in the step-down passive avoidance test." **Physiol Behav**, 2010.
- PALUDAN, S. R., BOWIE, A. G., *et al.* "Recognition of herpesviruses by the innate immune system." **Nat Rev Immunol** 11(2): 143-154, 2011.
- PAMPLONA, F. A.&TAKAHASHI, R. N. "WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors." **Neurosci Lett** 397(1-2): 88-92, 2006.
- PATEL, S.&HILLARD, C. J. "Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling." **J Pharmacol Exp Ther** 318(1): 304-311, 2006.
- PAUL, S., RICOUR, C., *et al.* "Type I interferon response in the central nervous system." **Biochimie** 89(6-7): 770-778, 2007.
- PERTWEE, R. G. "Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use." **Forsch Komplementarmed** 6 Suppl 3: 12-15, 1999.
- POBBE, R. L., DEFENSOR, E. B., *et al.* "General and social anxiety in the BTBR T+ tf/J mouse strain." **Behav Brain Res** 216(1): 446-451, 2011.
- RANG, H. P., RITTER, J. M., *et al.* **FARMACOLOGIA**, GUANABARA, 2001.
- REISS, C. S. "Cannabinoids and Viral Infections." **Pharmaceuticals (Basel)** 3(6): 1873-1886, 2010.
- RICHTER, K., WOLF, G., *et al.* "Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice." **Learn Mem** 12(4): 407-413, 2005.
- ROGERS, D. C., FISHER, E. M., *et al.* "Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment." **Mamm Genome** 8(10): 711-713, 1997.
- ROGERS, D. C., PETERS, J., *et al.* "SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice." **Neurosci Lett** 306(1-2): 89-92, 2001.
- ROTH, M. D., BALDWIN, G. C., *et al.* "Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on human immune function and host defense." **Chem Phys Lipids** 121(1-2): 229-239, 2002.
- ROZENBERG, F., DEBACK, C., *et al.* "Herpes Simplex Encephalitis : From Virus to Therapy." **Infect Disord Drug Targets**, 2011.
- RUSSO, E.&GUY, G. W. "A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol." **Med Hypotheses** 66(2): 234-246, 2006.
- RUTKOWSKA, M., JAMONTT, J., *et al.* "Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice." **Pharmacol Rep** 58(2): 200-206, 2006.

- SHENG, W. S., HU, S., *et al.* "Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes." **Glia** 49(2): 211-219, 2005.
- SOLBRIG, M. V., FAN, Y., *et al.* "A synthetic cannabinoid agonist promotes oligodendroglioneogenesis during viral encephalitis in rats." **Exp Neurol** 226(1): 231-241, 2010.
- TANASESCU, R.&CONSTANTINESCU, C. S. "Cannabinoids and the immune system: an overview." **Immunobiology** 215(8): 588-597, 2010.
- VILELA, M. C., LIMA, G. K., *et al.* "TNFR1 plays a critical role in the control of severe HSV-1 encephalitis." **Neurosci Lett** 479(1): 58-62, 2010.
- VILELA, M. C., MANSUR, D. S., *et al.* "Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study." **Neurosci Lett** 445(1): 18-22, 2008.
- VILELA, M. C., MANSUR, D. S., *et al.* "The chemokine CCL5 is essential for leukocyte recruitment in a model of severe Herpes simplex encephalitis." **Ann N Y Acad Sci** 1153: 256-263, 2009.
- WALD, A.&COREY, L. (2007). Persistence in the population: epidemiology, transmission. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. C.-F. G. ARVIN A, MOCARSKI E, MOORE PS, ROIZMAN B, WHITLEY R, YAMANISHI K, (ED.). Cambridge, Cambridge University Press.
- WICKHAM, S., LU, B., *et al.* "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(1-2): 51-59, 2005.
- WUEST, T. R.&CARR, D. J. "The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection." **Front Biosci** 13: 4862-4872, 2008.
- ZHANG, J.&CHEN, C. "Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation." **J Biol Chem** 283(33): 22601-22611, 2008.

ANEXOS

Anexo I – Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG (CETEA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 20/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Modulação do sistema endocanabinoide sobre respostas neuroinflamatórias no modelo de encefalite causada por herpes simplex virus tipo 1**", que tem como responsável(is) **Antonio Lucio Teixeira Junior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **13/ 04/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 20/2011**, related to the project entitled "**Cannabinoid modulation of neuroinflammatory responses in HSV-1 encephalitis**", under the supervisors of **Antonio Lucio Teixeira Junior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 13, 2011**.

This certificate expires in **April 13, 2016**.

Belo Horizonte, 13 de Abril de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 34-99-4516
www.ufmg.br/bioeticacetea - cetea@proq.ufmg.br

Anexo II - Artigos completos publicados em periódicos