



RESPOSTA IMUNOLÓGICA DESENCADEADA PELO *Vesiculovírus jurona*

LIDINEUSA MACHADO ARAÚJO; DIEGO SIQUEIRA SANTOS; MARIA SUELI BARBOSA CAVALCANTE; JOSÉ ANTONIO PICANÇO DINIZ JUNIOR

RESUMO

O estudo objetivou investigar a resposta imunológica desencadeada por um vírus isolado pelo Instituto Evandro Chagas denominado *Vesiculovirus Jurona*, no parênquima encefálico por meio da quantificação da produção de citocinas pró-inflamatórias e a quantificação da produção de óxido nítrico. Tratou-se de estudo experimental com camundongos da linhagem BALB/c fêmeas com aproximadamente 8 semanas de idade e a via intranasal. Ensaios imunoenzimáticos e quantificação de óxido nítrico foram realizados e analisados no 4º, 8º, 12º e 16º d.p.i. As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-6, IL-12p₄₀, TNF- α , IL-6 e quimiocina MCP-1 apresentaram um pico de elevação no 8º d.p.i, tendo esses mediadores inflamatórios níveis de redução no 16º d.p.i., período em que os sinais clínicos estavam ausentes. Não houve níveis significativos de NO nos tempos de sobrevida analisados. Concluiu-se que, o vírus produziu alterações no parênquima cerebral que regrediram gradativamente, levando a recuperação espontânea de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro.

Palavras-chave: Infecção viral; Resposta Inflamatória; Citocinas; Quimiocinas; Óxido nítrico.

1 INTRODUÇÃO

As infecções virais são importantes causas de doenças que promovem alterações comportamentais e imunológicas em populações humanas e animais, que podem representar importante proporção das sequelas neurológicas permanentes. O estudo teve como objeto de investigação o *Vesiculovirus jurona*, que foi isolado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) em 1962, de mosquitos *Haemagogus sp.* capturados na Floresta Amazônica no Km 87 da Rodovia Belém-Brasília. Estudos sorológicos realizados pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do IEC propuseram sua inclusão no gênero *Vesiculovirus* (KARABATSOS, 1985).

É importante ressaltar que, foi obtido a partir de sangue humano, cepas deste vírus em um paciente que residia no município de Costa Marques, no Estado de Rondônia, na fronteira com a Bolívia, cuja característica clínica apresentada foi doença febril, constatado a partir do exame de amostras de sangue (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998). Outras informações sobre a sintomatologia não foram registradas, nesse sentido, deve-se ampliar o olhar e os esforços

destinados a sua investigação.

São muitos os vírus que apresentam neurotropismo e desencadeiam uma resposta inflamatória no parênquima encefálico. Estudos experimentais envolvendo outros vesiculovirus demonstraram que, uma vez no SNC, estes vírus provocam uma resposta imunológica que pode destruir as células infectadas (DINIZ et al., 2008). Com o curso da infecção, mecanismos de defesa mais complexos e específicos são elaborados para estabelecer um estado antiviral capaz de limitar a replicação, disseminação dos vírus e a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas necessárias para atrair e ativar as células do sistema imune ao sítio da infecção.

A produção de citocinas quando é estimulada, elas influenciam na atividade, diferenciação, proliferação e na sobrevivência de células imunológicas, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas durante um processo inflamatório. Quando induzem a inflamação, são conhecidas como pró-inflamatórias, e quando suprimem a resposta imunológica, são denominadas anti-inflamatórias.

Durante uma infecção viral, além das citocinas, as quimiocinas também são produzidas e participam ativamente na resposta imune. As quimiocinas ou citocinas quimiotáticas são pequenas proteínas de ligação a heparina, que direcionam a migração de leucócitos circulantes para locais de inflamação ou dano tecidual. O óxido nítrico (NO) produzido por células do SNC ativadas, também atua na inibição da replicação viral por ação direta sobre o vírus e sobre as células hospedeiras, em contrapartida, a produção desregulada de NO, pode ocasionar danos às células do hospedeiro.

Os estudos experimentais a partir de infecções virais em animais de laboratório têm contribuído para as análises do comportamento destes agentes quando em contato com células, que além de revelar suas preferências, ainda podem servir de modelo de infecção para comparação com infecções em humanos. Em vista disso, o estudo objetivou investigar a resposta imunológica desencadeada pelo vírus jirafa no parênquima encefálico por meio da quantificação da produção de citocinas pró-inflamatórias e a quantificação da produção de óxido nítrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos Éticos e de Biossegurança

O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IEC, sob o protocolo CEUA Nº 05/2015, com observação das normas e critérios estabelecidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança. .

Animais para Experimentação e Inoculação Viral

A experimentação ocorreu em camundongos albinos da linhagem BALB/c adultos com 8 semanas de idade foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo Infectado (GI). Os animais foram inoculados por via i.n por meio de gotejamento em cada narina no volume de 0,01 mL de suspensão de encéfalos não infectados para o GC e inoculo contendo o vírus Jurona (Be AR 40578) para o GI na concentração 1:10 por três dias consecutivos com intervalo de 24h, e observados nos tempos de sobrevivência: 4º, 8º, 12º e 16º d.p.i.

Deteção de Citocinas e Óxido Nítrico

A dosagem das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α) e ON foram realizadas a partir de homogeneizados de encéfalos de animais adultos e aplicação da técnica de citometria de fluxo e ensaio imunoenzimático.

Citometria de Fluxo

A detecção de citocinas por citometria de fluxo foi realizada utilizando o Kit *Cytometric Bead Array* (CBA) – Mouse Inflammation (BD Biosciences) conforme instruções do fabricante, para a análise da expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1).

Ensaio Imunoenzimático

A detecção de citocinas por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) do tipo sanduiche foi realizada utilizando o Kit ELISA Set Mouse (BD Biosciences) conforme instruções do fabricante, para a análise da expressão das citocinas IL-12p40.

Reagente de Griess para quantificação de NO

A quantificação de nitrito (detecção indireta de NO) foi realizada utilizando o Kit Molecular Probes, conforme orientações do fabricante.

Análise Estatística

A análise estatística entre os GC e GI nos experimentos de dosagens de citocinas e nitrito foi realizada por meio do teste ANOVA Two-way e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc, EUA). Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05(*)$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6 detectadas por citometria de fluxo, a partir de sobrenadantes de homogenizados de encéfalos de camundongos do GC e GI, foram analisadas no 4º, 8º, 12º e 16º d.p.i. A análise da produção da citocina IFN- γ não mostrou diferenças significativas entre os animais do GC nos tempos avaliados. Já nos animais do GI, foi observado aumento significativo no 8º d.p.i. quando comparado com o GC. No 12º d.p.i. e 16º d.p.i., houve redução significativa da síntese desta citocina em relação ao GI do 8º d.p.i. (figura 21). Na análise da produção da citocina TNF- α não foi observado diferença significativa entre os animais do GC no 4º, 8º e 12º d.p.i., no entanto, os animais infectados mostraram aumento na produção dessa citocina a partir do 4º d.p.i., que só foi estatisticamente significativo no 8º e 12º d.p.i. em relação aos animais controle do respectivo período, reduzindo significativamente no 16º d.p.i. entre os animais infectados (Figura 22).

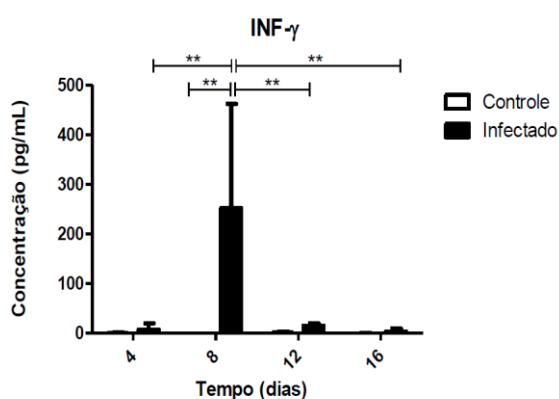


Figura 21 – Análise estatística da produção da citocina IFN- γ no encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8, 12 e 16 dias de infecção com o VJUR. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i.; 16 = 16 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com $p \leq 0,05$ (*).

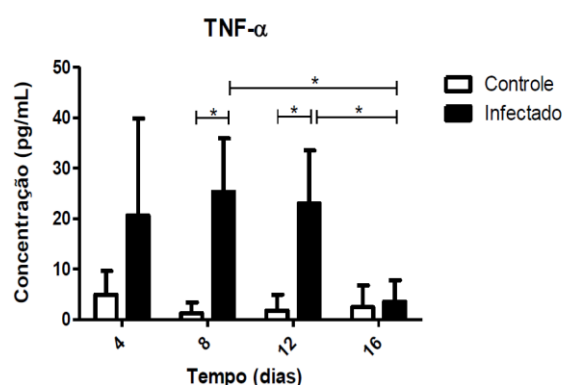


Figura 22 – Análise estatística da produção da citocina TNF- α no encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8, 12 e 16 dias de infecção com o VJUR. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i.; 16 = 16 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com $p \leq 0,05$ (*).

A análise da produção da citocina IL-6 não mostrou diferença significativa entre os animais do GC no 4º, 8º e 12º d.p.i., no entanto, os animais infectados mostraram aumento significativo dessa citocina no 4º e 8º d.p.i. em relação aos animais controle dos respectivos períodos, apesar da significância estatística ter sido observada somente no 8º d.p.i., que reduziu significativamente a produção no 12º e 16º d.p.i. entre os animais infectados (Figura 23). A IL-12P₄₀ teve sua produção aumentada significativamente nos animais do GI no 4º, 8º, 12º e 16º d.p.i. quando comparados com os animais do GC. Esse aumento também foi significativo entre

os animais do GI no 4º para o 8º e 12º d.p.i., reduzindo significativamente a produção no 16º d.p.i. Entre os animais do grupo controle não houve diferença significativa (figura 24).

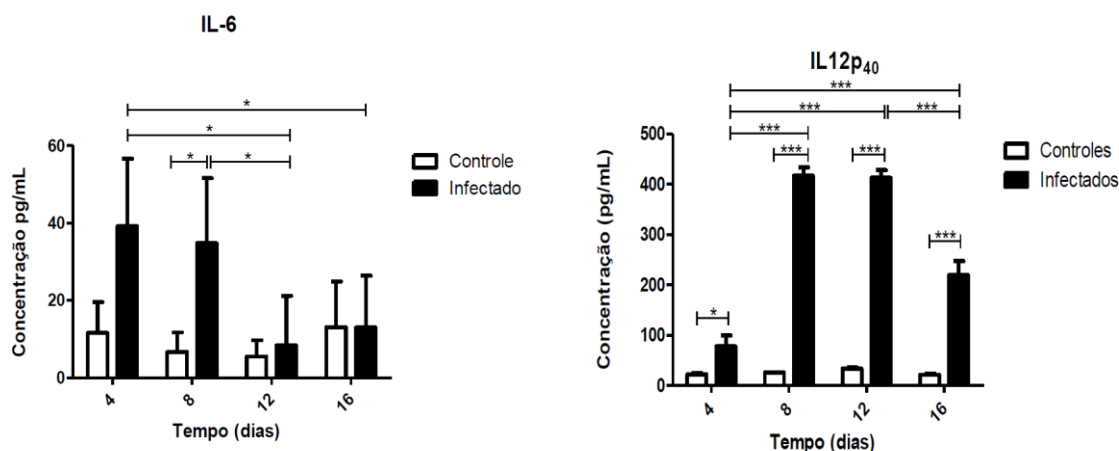


Figura 23 – Análise estatística da produção da citocina IL-6 no encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8, 12 e 16 dias de infecção com o VJUR. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i.; 16 = 16 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com $p \leq 0,05$ (*).

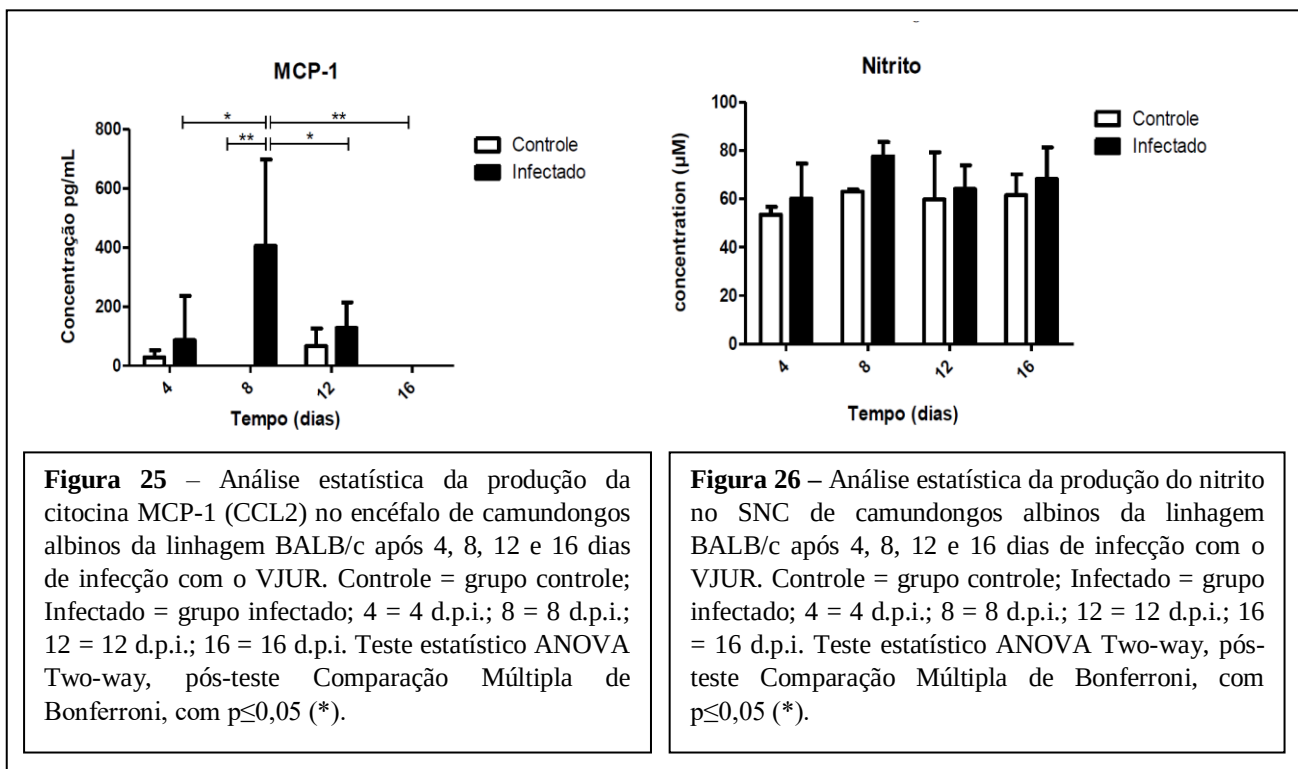
Figura 24 – Análise estatística da produção da citocina IL-12p40 no encéfalo de camundongos albinos da linhagem BALB/c após 4, 8, 12 e 16 dias de infecção com o VJUR. Controle = grupo controle; Infectado = grupo infectado; 4 = 4 d.p.i.; 8 = 8 d.p.i.; 12 = 12 d.p.i.; 16 = 16 d.p.i. Teste estatístico ANOVA Two-way, pós-teste Comparação Múltipla de Bonferroni, com $p \leq 0,05$ (*).

Nos animais infectados com o vírus Jurona, a detecção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-6, e IL-12p40 em concentrações elevadas, corroboram com os estudos com o VSV descritos por Steel et al. (2014). Esse aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias pode está associado à ativação de células gliais, principalmente as micróglias. Esses mediadores imunológicos facilitam a recuperação de células neuronais que sofreram algum tipo de dano durante uma infecção.

Uma elevação na produção de IFN- γ no 8º d.p.i. nos camundongos infectados com o vírus Jurona, pode estar relacionada com a ativação de células gliais e a presença de outras citocinas como IL-6, TNF- α e IL-12, que também tiveram um aumento significativo (LIU et al., 2007). Níveis elevados dessa citocina pode ocasionar a produção de quimiocinas que favorecem ao aumento do recrutamento de linfócitos para o sítio de infecção (como observado em nosso trabalho no 8º d.p.i.) e por conseguinte, maior liberação de INF- γ para o processo de eliminação do vírus.

A produção da quimiocina MCP-1 nos animais do GC não foi significativa, da mesma forma entre os animais do GC e GI no 4º, 12º e 16º d.p.i., porém somente no 8º d.p.i. houve diferença estatística entre CG e GI. A análise entre os animais infectados mostrou aumento

significativo do 4º para o 8º d.p.i., reduzindo significativamente a produção a partir do 12º d.p.i (figura 25). A análise da produção de NO por meio da quantificação de nitrito foi realizada através da técnica indireta utilizando o reagente de Griess. Não foi evidenciados níveis de expressões significativas de NO nos animais infectados se comparados aos animais controles nos tempos analisados, embora houvesse um discreto aumento nos animais infectados, principalmente no 8º d.p.i.(figura 26).



A produção exacerbada de MCP-1 pareceu estar envolvida com o óbito de camundongos inoculados por via i.n. com o VSV. Nossos dados mostraram um pico de elevação significativo na produção da MCP-1 no 8º d.p.i. nos animais infectados com o VJUR, dessa forma, é provável que a elevação nos níveis dessa quimiocina tenha ocorrido por ação do $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, contribuindo para o recrutamento leucócitos para as áreas de lesões observadas, evidenciado nos infiltrados de linfócitos no bulbo olfatório e corpo estriado nos achados histopatológicos.

Em condições patológicas, altas concentrações de NO parece estar envolvida em processos de desmielinização e em outras doenças neurodegenerativas (SAHA; PAHAN 2006). O nosso trabalho evidenciou níveis elevados de NO, embora estatisticamente não significativo quando comparado animais infectados com os animais controle. Desta forma, é possível que o NO não seja a molécula responsável pela diminuição da infecção pelo VJUR. A identificação de outras moléculas envolvidas na eliminação do VJUR permanece em aberto e devem constituir objetos de futuras investigações.

4 CONCLUSÃO

A patogênese induzida com o vírus Jurona demonstrou seu tropismo por células do SNC como outros *Vesiculovírus*, constatada pela ocorrência de lesões importantes no parênquima encefálico, com resposta em sequência do hospedeiro contra a infecção através da expressão de mediadores imunológicos, que favoreceram à recuperação dos animais infectados. Foi possível o desenvolvimento de um processo inflamatório agudo meningoencefálico que vai de uma lesão leve a um pico intenso no 8º dia com regressão gradativa, que levou a recuperação espontânea de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

DINIZ, J. A. P.; SANTOS, Z. A.; BRAGA, M. A. G. , DIAS, A. L. B.; SILVA, D. E. A.; MEDEIROS, D. B. A.; BARROS, V. L. R. S.; CHIANG, J. O.; ZOGHBI, K. E. F.; QUARESMA, J. A. S.; TAKIYA, C. M.; MOURA NETO, V.; SOUZA, W.; VASCONCELOS, P. F. C.; PICANÇO-DINIZ, C. W. Early and Late Pathogenic Events of Newborn Mice Encephalitis Experimentally Induced by Itacaiunas and Curionopolis Bracorhabdoviruses Infection. PLoS ONE, v. 3, n. 3, 2008. p. 1-12.

KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses. 3rd. ed. San Antonio, USA. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985. v. 2, p. 1147.

LIU, A.; HAN, Y. R.; LI, J.; SUN, D.; OUYANG, M.; PLUMMER, M. R.; CASACCIABONNEFIL, P. The glial or neuronal fate choice of oligodendrocyte progenitors is modulated by their ability to acquire an epigenetic memory. Journal of Neuroscience, v. 27, n. 27, p. 7339- 7343, 2007.

SAHA, R. N.; PAHAN, K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. Antioxidants Redox Signal, v. 8, n. 5-6, p. 929-947, 2006.

STEEL, C. D.; BREVING, K.; TAVAKOLI, S.; KIM, W. K.; SANFORD, L. D.; CIAVARRA, R. P. Role of peripheral immune response in microglia activation and regulation of brain chemokine and proinflammatory cytokine responses induced during VSV encephalitis. Journal of Neuroimmunology, v. 267, n. 1, p. 50-60, 2014.

SULTANI, M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. Chemotherapy Research and Practice, v. 2012, art. 490804, p. 1-11, 2012.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; PINHEIRO, F. P.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DIAS, L. B.; CRUZ, A. C. R. Arboviruses isolated in Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon Region, their known hosts, and their pathology for man. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Ed.). An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. 93 p.