



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
CURSO DE DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

EUZÉBIO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CITOCÍNICA NA INFECÇÃO
HUMANA PELO *VIRUS OROPOUCHE* E SUA RELAÇÃO COM O PADRÃO DE
SOROCONVERSÃO E A PRESENÇA DE SINTOMAS**

Belém

2011

EUZÉBIO DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CITOCÍNICA NA INFECÇÃO HUMANA PELO *VIRUS OROPOUCHE* E SUA RELAÇÃO COM O PADRÃO DE SOROCONVERSÃO E A PRESENÇA DE SINTOMAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA/NMT), como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Área de concentração: Patologia das Doenças Tropicais

Orientador: Prof.^o Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Belém

2011

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Oliveira, Euzébio de.

Caracterização da resposta imune citocínica na infecção humana pelo *vírus oropouche* e sua relação com o padrão de soroconversão e a presença de sintomas / Euzébio de Oliveira; orientador, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos. – 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2011.

1. Citocinas. 2. Arbovirus. 3. Infecções por arbovírus. 4. *Vírus oropouche*. I. Vasconcelos, Pedro Fernando da Costa, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 579.2562

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira Moreira NMT/UFPA

EUZÉBIO DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CITOCÍNICA NA INFECÇÃO HUMANA PELO *VIRUS OROPOUCHE* E SUA RELAÇÃO COM O PADRÃO DE SOROCONVERSÃO E A PRESENÇA DE SINTOMAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical - Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Área de concentração: Patologia das Doenças Tropicais

Data da aprovação: 19 de dezembro de 2011.

Banca examinadora:

Prof.^o Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos (Orientador)
Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS

Prof.^o Dr. Olindo Assis Martins Filho (Titular)
Centro de Pesquisa René Rachou – CPqRR/Fundação Oswaldo Cruz/MS

Prof.^a Dra. Lívia Carício Martins (Titular)
Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS

Prof.^o Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes (Titular)
Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS

Prof.^o Dr. Alexandre do Rosário Casseb (Titular)
UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia

Dra. Elizabeth Salbé Travassos da Rosa (Suplente)
Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS

Belém – Pará

2011

Dedico este trabalho a minha família: meus pais João de Oliveira e Catarina Gonçalves de Oliveira, e meus irmãos, Lurdete de Oliveira, Oldair Brás de Oliveira, Ademir de Oliveira, Ivacir de Oliveira, Claudete Geni de Oliveira, Noirides Antônio de Oliveira e Margarete de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida iluminando meus caminhos, me dando força e permitindo assim mais essa realização profissional e evolução pessoal;

- À minha preciosa família que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida, sempre me incentivando na conquista dos meus objetivos;

- Ao Prof.^o Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, meu orientador, por sua confiança, incentivo, paciência, profissionalismo e grandiosa orientação durante a realização desse trabalho;

- Aos professores e colegas do curso de Doutorado do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, que contribuíram com a construção de meus conhecimentos acadêmicos;

- A todos os amigos e colegas da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (SAARB). Muito obrigado pela amizade, companheirismo e profissionalismo.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes (SAARB/IEC), pelos ensinamentos sobre o *Vírus Oropouche*;

À Dra Lívia Caricio Martins, pela amizade e pelos ensinamentos sobre sorologia dos arbovírus;

- Agradecimento especial aos queridos amigos (as) da SAARB: Milene Silveira; Mayra Silva; Darlene Schmitt e Samir Casseb;

- Agradecimento muito especial aos amigos de todos os momentos: Marconi Lemos Moraes, Diogo Cristo da Silva e José Adelmo de Barros, por suas preciosas amizades, parcerias, incentivos, momentos de descontração e de alegria. Cada um

com suas particularidades me mostraram o poder e a importância de verdadeiras amizades em minha vida;

- À Universidade Federal do Pará/Núcleo de Medicina Tropical e ao Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, que me propiciaram a realização desse curso de Doutorado;

- Ao Instituto Evandro Chagas/SVS/MS por meio da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB), pelo acolhimento e financiamento dessa Pesquisa;

- Ao CNPq pelo apoio financeiro proporcionado, o que contribuiu muito para a realização do presente trabalho;

- Ao Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), da Fundação Oswaldo Cruz/MS, Belo Horizonte, onde realizei todos os experimentos necessários ao desenvolvimento desta tese;

- À Dra Andréa Teixeira de Carvalho (CPqRR/Fiocruz) pela valiosa ajuda nos ensinamentos e na realização dos experimentos laboratoriais, bem como pelo auxílio nas análises dos dados obtidos;

- Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho (CPqRR/Fiocruz), pelas suas precisas orientações durante a realização deste trabalho;

- Um agradecimento muito especial à Dra Ana Carolina Campi Azevedo (CPqRR/Fiocruz) pela sua paciência, suas orientações, bem como por sua grandiosa e imprescindível ajuda durante as análises, confecções de gráficos e interpretações dos resultados;

- Agradeço também a todas as demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e concretização desse trabalho.

Muito obrigado!

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

RESUMO

A tese aqui apresentada trata-se do primeiro estudo em nível mundial que pesquisa e caracteriza a resposta imune citocínica em infecções humanas pelo *Orthobunyavirus Oropouche*. Como metodologia para o alcance dos objetivos aqui apresentados foi utilizado um total de 320 amostras de soros humanos, onde 60 destas foram provenientes de Banco de Sangue (Controle negativo) e 260 foram obtidas mediante dois surtos do *Vírus Oropouche* nos Estados do Pará e Amapá (Brasil), sendo estas últimas divididas em oito subgrupos para obtenção dos dados com exatidão. Nas amostras coletadas foram realizadas análises dos dados clínicos/sintomatologia através dos prontuários, dados sorológicos através da titulação de anticorpos por Inibição da Hemaglutinação (IgM/IgG) e detecção do nível de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo a qual permitiu a descrição técnica da dosagem de citocinas possibilitando ainda a análise de frequência de baixos e altos produtores de citocina. Os dados obtidos permitiram observar as variáveis e o comportamento das assinaturas de citocinas expressas pelos pacientes mediante a confirmação sorológica do vírus, bem como o comportamento destes analitos séricos quando da presença de sintomas específicos como febre, calafrios, cefaléia e tontura, permitindo assim que se chegasse à conclusão que a) existe um padrão na síntese de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras; b) observa-se um balanço no perfil da resposta imune entre citocinas pró-inflamatórias (Th1) e moduladoras (Th17); c) a infecção pelo *Vírus Oropouche* altera a produção das citocinas nos indivíduos; d) os resultados mostram também que ao comparar os indivíduos Não respondedores com os Respondedores precoces, houve aumento da IL-1 β e diminuição da IL-12; Não respondedores com Respondedores tardios, houve diminuição da IL-8, e aumento da IFN- α , IL-23 e IL-17; Não respondedores comparados com Respondedores precoces ocorreram o aumento de IL-4 e IFN- γ ; Já quando comparado Respondedores precoces e respondedores tardios houve diminuição de IFN- α e IL-6; Respondedores precoces de forma geral apresentaram diminuição da IL-10 e Respondedores tardios apresentaram aumento da IL-5; e) Os resultados mostram ainda a expressão de IL-5 em pacientes que manifestaram os sintomas específicos para a infecção pelo Oropouche (febre, calafrios, cefaléia e tontura), sugerindo este sinal estar associado diretamente à patogênese do vírus; f) há a necessidade da complementação desta pesquisa com mais estudos como àqueles relacionados com a expressão de quimiocinas.

Palavras-chave: Resposta imune. Citocinas. Infecções Humanas. *Vírus Oropouche*.

ABSTRAT

This thesis is the first global study that researches and analyzes the immune response of cytokine in human infections by *Orthobunyavirus Oropouche virus*. The study used 320 samples of human serum. Sixty were from the Blood Bank (negative control) and 260 were obtained from two outbreaks of the Oropouche virus in the State of Pará and Amapá (Brazil). The latter was divided into 8 subgroups for better data accuracy. The collected samples were analyzed for clinical data/symptoms with serologic testing by titration of antibodies by the hemagglutination inhibition (IgM/IgG) and the detection cytokines plasma levels by flow cytometry. This allowed for the technical description of cytokine. The data obtained allowed for the observation of the characteristics and the behavior of the cytokines signatures expressed by patients by the presence or not of the virus. This also allowed for the observation of changes to serum through the presence of specific symptoms such as fever, chills, headache and dizziness. This led to the following conclusions a) there is a pattern in the synthesis of pro-inflammatory and regulatory cytokines; b) there is a balance in the profile of the immune response between pro-inflammatory cytokines (Th1) and modulators (Th17); c) an infection by the *Oropouche virus* alters the production of cytokines in individuals; d) the results also show that when comparing individuals no responders with early responders, there was an increase of IL-1 β and decreased IL-12; no responders with late responders, there was a decrease of IL-8, and increased IFN- α , IL-23 and IL-17; No responders occurred early responders compared with the increase IL-4 and IFN- γ ; However, when compared early responders and late responders, decreased IFN- α and IL-6; early responders generally showed a decrease in IL-10 and late responders showed an increase in IL-5; e) The results also show the expression of IL-5 in patients who showed symptoms specific for Oropouche infection (fever, chills, headache and dizziness), suggesting this signal to be directly associated with pathogenesis of the virus; f) there is a need to complement this research with more studies such as those related to the expression of chemokines.

Keywords: Immune response. Cytokines. Human infections. *Virus Oropouche*.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 - Principais citocinas, suas células produtoras e principais alvos celulares e efeitos biológicos.	43
Quadro 02: Frequência dos sintomas/sinais clínicos apresentados pelo grupo dos respondedores precoces diante a infecção pelo VORO.	55
Quadro 03: Dados sorológicos/titulação de anticorpos (IgM e IgG) apresentados pelo grupo dos respondedores precoces diante a infecção pelo VORO.	56
Figura 1: Figura adaptada de Pascoal (2005). Plataforma de esferas no sistema CBA.	59
Figura 2: Cálculo do ponto de corte para segregar baixos e altos produtores de citocinas, empregando a mediana global dos valores de citocinas.	61
Figura 3: Montagem do perfil panorâmico de citocinas de cada indivíduo e a curva ascendente da assinatura de citocinas, revelando as frequências de altos produtores de citocinas do Grupo Controle.	66
Figura 4: Análise comparativa da assinatura de citocinas do Grupo controle e a frequência de altos produtores de citocinas dos grupos Não respondedores (A) e Respondedores precoces (B).	68
Figura 5: Análise comparativa da assinatura de citocinas do Grupo controle e a frequência de altos produtores de citocinas dos grupos Respondedores precoces (A) e Respondedores tardios (B).	70
Figura 6: A soroconversão está associada a alterações nas assinaturas de Citocinas.	72
Figura 7: Assinaturas de citocinas séricas de indivíduos Não respondedores sintomáticos (A) e assintomáticos (B) na 1ª coleta.	74
Figura 8: Impacto do amadurecimento na assinatura de citocinas séricas de Respondedores precoces (A) e Respondedores precoces prolongados (B).	76
Figura 9: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e os títulos de anticorpos.	77
Figura 10: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de febre.	79
Figura 11: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos	

Respondedores precoces e a presença de calafrios.	80
Figura 12: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de cefaléia.	82
Figura 13: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos respondedores precoces e a presença de tontura.	83
Figura 14: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de febre, calafrios, cefaléia e tontura Simultaneamente.	84

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRAT

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 OS ARBOVÍRUS	15
2.2 FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i>	17
2.3 GÊNERO <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i>	18
2.4 O VÍRUS <i>OROPOUCHE</i> (VORO)	20
2.5 EPIDEMIOLOGIA	21
2.6 TRANSMISSÃO DO VORO	23
2.7 INCIDÊNCIA DO VÍRUS <i>OROPOUCHE</i>	25
2.8 SINTOMAS CLÍNICOS E PATOGÊNESE DA FEBRE DO OROPOUCHE	26
2.9 DIAGNÓSTICO	31
2.9.1 Diagnóstico laboratorial	31
2.9.2 Diagnóstico diferencial	32
2.10 TRATAMENTO	33
2.11 PROFILAXIA	34
2.12 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E GENÔMICAS DO VORO	35
2.13 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	36
2.14 CICLO REPLICATIVO	37
2.15 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ÀS INFECÇÕES VIRAIS	39
2.16 CITOCINAS	42
2.17 RESPOSTA IMUNE CITOCINICA À INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS	45
3 JUSTIFICATIVA	50
4 OBJETIVOS	51
4.1 OBJETIVO GERAL	51
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5 MATERIAL E MÉTODO	52

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS	52
5.2 OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS	54
5.3 DADOS SOROLÓGICOS	55
5.4 DETECÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	56
5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	57
5.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS DE AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	58
5.7 ANÁLISE DE FREQUENCIA DE BAIXOS E ALTOS PRODUTORES DE CITOCINAS	60
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
6 ASPECTOS ÉTICOS	63
7 FINANCIAMENTO DO ESTUDO	64
8 RESULTADOS	65
9 DISCUSSÃO	85
10 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	114
ANEXO A	115
ANEXO B	116

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus denominado arbovírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998; PINHEIRO et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007). A distribuição geográfica dos arbovírus é ampla. Entretanto, observa-se predominância dos arbovírus nas regiões tropicais do globo (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997).

Dentre os arbovírus, os incluídos na família *Bunyaviridae* ocupam destacada posição entre os agentes causadores de doenças infecciosas emergentes em centros urbanos (GUBLER, 1998). Entre os membros dessa família, destaca-se o *Vírus Oropouche* (VORO), pertencente ao gênero *Orthobunyavirus* (FAUQUET et al., 2005).

O VORO é um importante patógeno, que em humanos causa doença febril aguda, a chamada febre do Oropouche. Esse vírus tem acometido milhares de pessoas nos últimos 50 anos (GUBLER, 1998; PINHEIRO et al., 2004; SCHMALJOHN e HOOPER, 2006; NUNES et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009). No ciclo urbano ou epidêmico, o vírus é transmitido em maior escala de pessoa a pessoa pela picada do inseto antropofílico da espécie *Culicoides paraensis* informalmente conhecido na Amazônia brasileira como maruim (PINHEIRO et al., 1982a; LINLEY et al., 1983).

Clinicamente, a febre do Oropouche se manifesta sob a forma de um quadro febril agudo com temperaturas de até 40°C. A febre costuma vir acompanhada por dores no corpo, cefaléia, mialgias, artralgias, anorexia, tontura, calafrios e fotofobia. Alguns pacientes apresentam também náuseas, vômitos, diarreia, congestão conjuntival, dor epigástrica, dor retro ocular e outras manifestações sistêmicas (PINHEIRO et al., 1981a). Outro fator marcante associado à febre do Oropouche, é que alguns dias após o término do episódio febril inicial, comumente se observa a recorrência dos sintomas, porém, em geral com menor intensidade. Entretanto, até o momento não se conseguiu demonstrar a presença viral nessas crises de recorrência (PINHEIRO et al., 1981b; PINHEIRO et al., 1997).

Pouco se conhece a respeito da patogênese do VORO em humanos. Alguns achados relatados, usando modelos experimentais em animais, como hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), mostraram alterações ultraestruturais como

necrose de hepatócitos, em fígados de hamsters (ARAÚJO et al., 1978). Apresenta ainda elevada viremia e possui marcante tropismo por fígado e cérebro (PINHEIRO et al., 1982a). Desenvolvem infecção sistêmica, com detecção de altos títulos de vírus no plasma (RODRIGUES, 2004).

Não existem estudos específicos referentes à resposta imunológica citocínica em humanos ou animais acometidos pelo VORO. Os dados até então descritos referem-se a alguns estudos realizados com outros arbovírus, pertencentes à família *Flaviviridae*, por exemplo, onde se tem demonstrado a participação de algumas citocinas, como o TNF- α nos processos inflamatórios e nos casos graves de algumas arboviroses como a Febre do Dengue (FD), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e na Febre Amarela (FA) (QUARESMA et al., 2006; BARROS et al., 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OS ARBOVÍRUS

De acordo com a terceira edição do “*International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates*”, os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, sendo registrados 537 tipos diferentes que estão distribuídos por quase todos os continentes (KARABATSOS, 1985).

Os arbovírus, termo derivado da expressão inglesa *arthropod-borne virus*, são agentes virais ecologicamente distintos com uma característica comum que é a transmissão biológica por artrópodes hematófagos. Esses vírus apresentam uma distribuição cosmopolita, mas com maior prevalência nas regiões tropicais (PINHEIRO et al., 1997; AZEVEDO et al., 2007).

A Organização Mundial da Saúde em 1967 adotou o conceito de que os arbovírus são vírus que se perpetuam em natureza, principalmente por propagação entre hospedeiros suscetíveis e artrópodes hematófagos, ou pela transmissão transovariana ou venérea em artrópodes. Este grupo inclui vírus de diferentes famílias, como *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* e *Asfarviridae*, responsáveis por algumas das doenças humanas e veterinárias consideradas mais graves (WHO, 1985; WEAVER, 1997; MURPHY, 1999; BEDIN, 2007).

Esses vírus são capazes de se multiplicar e produzir viremia nos vertebrados, de se multiplicar em tecidos de artrópodes e de serem passados a novos hospedeiros vertebrados suscetíveis, após um período de incubação extrínseco (WHO, 1985).

A replicação viral no animal hospedeiro provoca viremia com título e duração suficientes para permitir a infecção de outro artrópode, que venha a se alimentar do mesmo hospedeiro (MORSE, 1993; TIMBURY, 1994; BROOKS et al., 2000; RACZ, 2005). No artrópode o vírus se replica principalmente no intestino e por ingurgitação atinge as glândulas salivares, onde causa uma infecção persistente podendo ser então transmitido horizontalmente, que é a forma natural de transmissão (WEAVER, 1997; WEAVER e BARRETT, 2004).

Outros mecanismos de transmissão incluem a transmissão venérea e/ou vertical (transovariana). Uma vez infectados, os artrópodes permanecem assim por

toda sua vida (MARCONDES, 2001). Num ciclo de infecção natural não ocorrem, aparentemente, efeitos prejudiciais tanto no artrópode quanto no hospedeiro vertebrado. Contudo nos ciclos urbanos dos arbovírus, no qual o homem é o principal hospedeiro vertebrado, ocorre o desenvolvimento da doença (GUBLER, 2002).

A região Amazônica brasileira é, provavelmente, a mais rica reserva de arbovírus do mundo, graças à diversidade de artrópodes e vertebrados terrestres e arbóreos, além de uma série de condições ecológicas favoráveis a sobrevivência deles em natureza (VASCONCELOS et al., 2001).

Durante o período de 1954 a 2007, no Brasil, foi possível isolar pelo menos 210 tipos diferentes de arbovírus, dos quais 196 na Amazônia. Os vírus encontram-se distribuídos em diversas famílias de vírus e outros vírus sem taxonomia definida. Desse total, 160 foram isolados pela primeira vez no país, com pelo menos 100 tipos novos para o mundo (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1986; MARTINS et al., 2007; FIGUEIREDO, 2007). Na Amazônia, 34 arbovírus já foram associados com infecção em humanos, alguns inclusive ocasionando quadros graves que podem levar a morte (VASCONCELOS et al., 1992; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2001).

Os arbovírus provocam doenças conhecidas como arboviroses, que podem ocorrer de forma endêmica ou epidêmica e alguns, como por exemplo, o *Vírus Oropouche* (VORO), *Vírus da Dengue* (VDEN), *Vírus da Febre Amarela* (VFA) e o *Vírus Mayaro* (VMAY), representam sérios problemas de saúde pública, pois, além de causarem epidemias, são responsáveis por considerável morbidade e/ou letalidade em seres humanos no Brasil e no exterior (VASCONCELOS et al., 1992).

Segundo dados do Ministério da Saúde, atualmente no Brasil a arbovirose de maior importância em saúde pública é a febre da Dengue. No ano de 2001, quando o terceiro sorotipo foi isolado no país, a incidência da doença aumentou drasticamente, atingindo o recorde de 794 mil casos (BRASIL, 2006). Em 2007, somente no Brasil, foram registrados 560 mil casos, 2/3 do total de casos de dengue registrado nas Américas (WHO, 2007). Desde então o vírus da Dengue continuou se espalhando pelo país, e atualmente praticamente todos os Estados da nação já tiveram registros da doença. De acordo com o último balanço epidemiológico realizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, somente no ano de 2011, até o mês

de outubro, houve um registro de um total de 721.546 casos de dengue no país (BRASIL, 2011).

A febre do Oropouche, que é a doença causada pelo *Vírus Oropouche*, pertencente à família *Bunyaviridae*, causou nas Américas aproximadamente 500 mil casos (PINHEIRO et al., 2004; AZEVEDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009). Segundo dados epidemiológicos, no Brasil a febre do Oropouche é a segunda arbovirose com o maior número de registros, sendo superada apenas pela febre do Dengue (FIGUEIREDO, 1999; PINHEIRO et al., 2004; FIGUEIREDO, 2007; VASCONCELOS et al., 2009).

2.2 FAMÍLIA *BUNYAVIRIDAE*

A família *Bunyaviridae* foi estabelecida no ano de 1975, buscando compreender uma grande variedade de vírus que compartilhavam propriedades morfológicas e antigênicas comuns, sendo que atualmente, representa a maior família de vírus conhecida (ICTV, 2005). Essa família é formada por cinco gêneros (*Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*) e vários outros vírus que não estão incluídos nesses gêneros e que podem constituir no futuro novos gêneros. Os membros dos gêneros *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*, infectam animais, já os membros do gênero *Tospovirus*, infectam plantas (FAUQUET et al., 2005). Essa família inclui mais de trezentos vírus distintos (MERTZ, 1997). A maioria dos vírus pertencentes à família *Bunyaviridae* são arbovírus e alguns deles ocupam destacada posição entre os agentes causadores de doenças infecciosas emergentes de importância em saúde pública e veterinária (GUBLER, 1998; FAUQUET, 2005).

Os vírus dessa família são reconhecidos por causarem doenças humanas graves e freqüentemente fatais, com a sintomatologia variando entre casos febris, encefalites, febres hemorrágicas e síndromes respiratórias e renais fatais, o que ocorre, por exemplo, nas infecções pelo *Vírus da febre do Vale Rift* (gênero *Phlebovírus*), pelo *Vírus da febre hemorrágica do Congo e da Criméia* (gênero *Nairovirus*) e pelo *Vírus La Crosse* da encefalite da Califórnia (gênero *Bunyavirus*) (MANGIAFICO et al., 1988; MERTZ, 1997). A maioria desses vírus é transmitida por artrópodes, primariamente mosquitos, carrapatos, phlebotomíneos ou maruins, e

mantidos em natureza como zoonoses (KARABATSOS, 1985; DÉGALLIER et al., 1989).

Os hospedeiros vertebrados desses vírus, representados principalmente por animais silvestres como mamíferos (roedores, primatas, marsupiais entre outros) e aves, são utilizados pelos vírus para a sua manutenção e persistência em natureza, sendo que a infecção nesses animais é comumente aguda com um breve período de viremia. Em geral, a infecção em humanos é acidental e ocorre quando as pessoas se expõem ao contato com transmissores/vetores infectados pelos vírus (GONZALEZ-SCARANO e NATHANSON, 1996; NICHOL et al., 2005; SCHMALJONH e NICHOL, 2007).

No entanto, existem exceções a essas características, pois os hantavírus que não são considerados arbovírus, infectam roedores e têm mecanismos de transmissão relacionados à inalação de aerossóis das excretas destes animais infectados. Cada hantavírus mantém seu ciclo de vida em uma única espécie de roedor hospedeiro, sendo que nesses animais, os hantavírus causam uma infecção persistente assintomática (SCHMALJOHN e HJELLE, 1997; BISHOP e SHOPE, 1979; GONZALEZ-SCARANO e NATHANSON, 1996; NICHOL et al., 2005; ELLIOTT, 2008).

Contudo, existem ainda muitos outros vírus da família *Bunyaviridae* que se desconhece até o momento associação com doença ou mesmo infecção em humanos. (GONZALEZ-SCARANO e NATHANSON, 1996; ELLIOTT, 1997; SCHMALJOHN e PATTERSON, 2001; ELLIOTT, 2008).

No Brasil, foram isoladas dezenas de arbovírus da família *Bunyaviridae* tendo alguns associados com infecções graves em humanos. Dentre esses, está o *Vírus Oropouche* do gênero *Orthobunyavirus*, sendo o mais importante deles do ponto de vista epidemiológico, por causar epidemias extensas, sobretudo na Região Amazônica acometendo milhares de pessoas (VASCONCELOS et al., 1992; PINHEIRO ET AL., 2004; VASCONCELOS et al., 2011).

2.3 GÊNERO *ORTHOBUNYAVIRUS*

O gênero *Orthobunyavirus* compreende atualmente o total de 166 vírus (tipos e subtipos), distribuídos em 48 espécies virais. Esse gênero apresenta três espécies de

vírus com tentativas de inclusão, e 22 vírus ainda não classificados. Com base em testes sorológicos, os vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* apresentam classificação em pelo menos 18 sorogrupos distintos (FAUQUET et al., 2005).

A maioria dos membros desse gênero é transmitida por mosquitos, tendo uma minoria que é transmitida por carrapatos e culicídeos. Utilizam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados para a realização de seus ciclos de manutenção na natureza (BISHOP et al., 1980; DUTARY et al., 1989). Em geral, os ciclos de transmissão dos *Orthobunyavirus* não são complexos e apresentam uma notável estabilidade em sua manutenção e transmissão, utilizando, em geral, apenas uma espécie de vetor artrópode. A exceção a essa característica dos *Orthobunyavirus* é o que ocorre com o *Vírus da febre do Vale Rift*, pois o mesmo tem sido isolado em mais de 40 espécies de mosquitos de gêneros diferentes, inclusive moscas hematófagas como é o caso dos flebotomíneos (ELLIOTT, 2009).

A epidemiologia dos *Orthobunyavirus* é caracterizada para cada sorogrupo pertencente a esse gênero. O grupo Simbu, por exemplo, é um dos maiores grupos sorológicos dentro desse gênero. Possui mais de 25 vírus antigenicamente relacionados, que têm sido isolados em todos os continentes, exceto na Europa (CALISHER, 1996, ICTV, 2005). A classificação dos vírus pertencentes ao sorogrupo Simbu tem sido realizada com base no relacionamento antigênico mediante aplicação de testes de inibição da hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e neutralização (N). O sorogrupo Simbu encontra-se ainda subdividido em cinco complexos antigênicos denominados: Simbu, Manzanilla, Oropouche, Thimiri e Nola (KINNEY e CALISHER, 1981).

Alguns desses vírus têm sido listados como causadores de doenças em humanos. Dentre eles o *Vírus Oropouche* (VORO), incluído no complexo Oropouche, que tem causado importantes epidemias de doença febril (febre do Oropouche), acometendo milhares de pessoas ao longo de muitas décadas, principalmente, na Amazônia brasileira (PINHEIRO et al., 1981b; NUNES et al., 2007); ressalte-se que tem sido também registradas epidemias fora do Brasil, como no Panamá e no Peru (CHAVEZ et al., 1992; WATTS et al., 1997; AZEVEDO et al., 2007; Pedro F. C. Vasconcleos - comunicação pessoal).

Dois outros vírus (*Vírus Akabane* (VAKA) e *Vírus Aino* (VAINO)), pertencentes a esse grupo antigênico, estão associados com doença em animais. Esses vírus

causam aborto e má formação congênita em bovinos, ovinos e caprinos, estando amplamente distribuídos na Ásia (oeste e sudeste) e na Austrália, provocando sérios problemas econômicos, relacionados com a criação desses rebanhos nessas regiões (INABA et al., 1975; SCHMALJONH e NICHOL, 2007).

2.4 O VÍRUS OROPOUCHE (VORO)

O VORO é um importante patógeno, que em humanos causa doença febril aguda, a febre do Oropouche (PINHEIRO, 1983; PINHEIRO et al., 1994; GUBLER, 1998; PINHEIRO et al., 2004 SCHMALJOHN e HOOPER, 2006). Esse vírus tem acometido milhares de pessoas nos últimos 50 anos (NUNES et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009). Sua principal característica é a capacidade de provocar surtos e/ou epidemias em centros urbanos em áreas tropicais da América do Sul e América Central, constituindo-se assim numa das arboviroses mais importantes para saúde pública na região Amazônica (BORBOREMA et al., 1982; PINHEIRO et al., 1985; PINHEIRO et al., 2004; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; NUNES et al., 2007).

O VORO é um dos arbovírus que mais freqüentemente causa epidemias de doença febril na região Amazônica brasileira. Segundo registros, depois da dengue, é a causa mais freqüente de arbovirose urbana do país (CRUZ et al., 2009) No entanto, o verdadeiro impacto do VORO na Amazônia brasileira deve ser ainda maior, pois o caráter inespecífico da doença febril pode levar a subestimar a sua real freqüência (PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 2004). Inquéritos sorológicos que foram realizados em períodos não epidêmicos, revelaram soropositividade para o VORO variando entre 0 e 10,7% em diferentes sub-populações amazônicas (PINHEIRO et al., 1997).

A febre do Oropouche é destacada como um exemplo de zoonose viral emergente, cuja freqüência tem crescido em decorrência do desmatamento acelerado e da conseqüente criação de novas fronteiras agropecuárias (MURPHY, 1998).

2.5 EPIDEMIOLOGIA

O primeiro isolamento do VORO ocorreu em Trinidad e Tobago no ano de 1955, quando o protótipo do vírus foi isolado a partir do sangue de um paciente febril residente no vilarejo denominado Vega del Oropouche (origem do nome dado ao vírus) e de um lote de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* (ANDERSON et al., 1961). O VORO foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1960, quando foi isolado de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) capturada às proximidades de uma área de floresta durante a construção da rodovia Belém-Brasília, bem como de um lote de mosquitos *Ochlerotatus serratus* (atualmente nomeado como *Aedes serratus*), capturados próximo da mesma área (PINHEIRO et al., 1962).

Em 1961, o vírus foi detectado novamente em Belém do Pará, ocasião em que uma grande epidemia de febre do Oropouche foi registrada, tendo sido estimado que cerca de 11 mil pessoas foram acometidas pela doença (PINHEIRO et al., 1962). A partir desse episódio, o VORO demonstrou seu grande potencial epidêmico e muitas outras epidemias, algumas de caráter altamente dispersivo, foram registradas em diferentes centros urbanos dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins (PINHEIRO et al., 1976; LE DUC et al., 1981; VASCONCELOS et al., 1989; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996; PINHEIRO et al., 2004).

Fora do Brasil há registros de ocorrências de infecção por VORO no Panamá, Perú, Suriname e Trinidad (CHÁVEZ et al., 1992; WATTS et al., 1997; PINHEIRO, 2004). Evidências de imunidade contra o VORO foram detectadas em primatas não humanos na Colômbia e Venezuela, sugerindo a presença deste arbovírus também naquele país (KARABATSOS, 1985).

Com raras as exceções, as ocorrências de febre do Oropouche têm sido na forma de epidemia urbana. De 1961 a 1996, mais de trinta epidemias de febre do Oropouche foram registradas no Brasil, sendo que Belém, capital do Estado do Pará, foi acometida pelas três maiores epidemias dos últimos 20 anos. O município de Santarém, bem como alguns vilarejos próximos, também foram afetados por duas grandes epidemias ocorridas em 1974 e 1975 (PINHEIRO et al., 1976; DIXON et al., 1981).

Aparentemente entre 1969 a 1980, a maioria das ocorrências do VORO foi restrita ao Estado do Pará, atingindo diversos municípios do Estado, localizados na região Metropolitana de Belém; na região Nordeste; Sudeste; Baixo Amazonas e na Ilha do Marajó, acometendo mais de 20 municípios no total (PINHEIRO et al., 1962; PINHEIRO et al., 1976; FREITAS et al., 1982; DIXON et al., 1981).

Somente no início da década de 80, é que epidemias do VORO foram registradas fora do Estado do Pará, notadamente nas cidades de Manaus e Barcelos, no Estado do Amazonas, e na cidade de Mazagão, Estado do Amapá (BORBOREMA et al., 1982; PINHEIRO, 1983). Novas epidemias da febre do Oropouche ocorreram em 1988, nas cidades de Porto Franco (Estado do Maranhão) e Tocantinópolis (Estado do Tocantins) (VASCONCELOS et al., 1989). O Estado de Rondônia somente veio a ser acometido pelo VORO em 1991, nas localidades de Ariquemes e Ouro Preto D'Oeste (PINHEIRO et al., 1994).

De 1981 a 1996, independente dos surtos do VORO ocorridos em outros Estados do país, surtos epidêmicos de febre do Oropouche continuaram ocorrendo no Estado do Pará, principalmente na mesorregião do Baixo Amazonas e na mesorregião do Sudeste do Estado (LE DUC et al., 1988; PINHEIRO et al., 1981b; BORBOREMA et al., 1982; VASCONCELOS et al., 1989; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996; PINHEIRO et al., 1998) . Em 1994 uma grande epidemia foi registrada em Serra Pelada (PA), acometendo mais de 6 mil pessoas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996).

Desde o surgimento das epidemias do VORO em 1960 até 1996, foi determinado por diagnóstico sorológico que mais de 357 mil pessoas foram acometidas por este vírus, sendo claramente uma estimativa bastante conservadora, pois é muito provável que mais de meio milhão de pessoas na região da Amazônia brasileira tenham sido infectadas pelo VORO desde 1961 (PINHEIRO et al., 1997).

Em 2001 o VORO foi isolado de uma amostra de fígado de um macaco do gênero *Callithrix* spp. no Parque Nacional Grande Sertão Veredas no Estado de Minas Gerais, região Sudeste do país, sugerindo a disseminação do vírus para estados daquela região brasileira, indicando ainda que sob condições ecológicas adequadas, o VORO pode atingir grandes aglomerações humanas fora da região da Amazônia Legal (NUNES et al., 2005).

Em 2003 e 2004, novos surtos de febre do Oropouche foram registrados nas cidades de Parauapebas e Porto de Moz, no Estado do Pará (AZEVEDO et al., 2007). Em 2006 o VORO voltou a causar epidemias no Pará, desta vez nos municípios de Maracanã, Igarapé-Açu, Magalhães Barata e Viseu, região Nordeste do Estado (VASCONCELOS et al., 2009). Em 2009, houve o reaparecimento do VORO no Estado do Pará, desta vez acometendo os municípios de Santa Bárbara, na região Metropolitana de Belém e Altamira na região Sudeste do Estado. Também ressurgiu no Estado do Amapá no município de Mazagão (VASCONCELOS et al., dados não publicados).

Fora do Brasil as epidemias também ocorreram, tendo sido registradas no Panamá em 1989, no Vilarejo de Benjuco (EVELIA QUIROZ et al., 1989, dados não publicados; PINHEIRO et al., 2004), e no Peru em 1992, atingindo a cidade de Iquitos (CHAVEZ et al., 1992; WATTS et al., 1997), e em 1994 ainda no Peru acometendo as cidades de Puerto Maldonado e Madre de Dios, na região amazônica daquele país andino (PERU e NAMRID, 1994). Em 2005, testes sorológicos e moleculares realizados em amostras coletadas na Argentina, na Província de Jujuy, evidenciaram a circulação do VORO naquela região (FABBRI, C.; NUNES, M.R.T., 2005, dados não publicados).

O VORO segue uma distribuição Sazonal, pois as maiores epidemias de febre do Oropouche ocorreram normalmente no período chuvoso da região Amazônica brasileira (janeiro a junho) (PINHEIRO et al., 2004). Essa característica provavelmente está associada à maior densidade populacional nesse período, do *Culicoides paraensis*, principal vetor transmissor do vírus para humanos provocado pelo aumento dos criadouros naturais e artificiais decorrentes das chuvas. Fora desse período os surtos e epidemias se apresentam com menor intensidade (PINHEIRO et al., 1981a).

2.6 TRANSMISSÃO DO VORO

Um estudo detalhado foi publicado pelo grupo de pesquisa do Instituto Evandro Chagas em 1981, no qual realizaram um levantamento sorológico em animais da fauna do Estado do Pará, na tentativa de encontrar hospedeiros selvagens e/ou domésticos, bem como prováveis vetores para o VORO. Nesse

trabalho foram realizados vários testes laboratoriais, como inibição de hemaglutinação, ensaio de neutralização *in vitro*, isolamento viral no soro de vertebrados, incluindo marsupiais, roedores, aves, primatas, morcegos, cachorros, gatos, bichos-preguiça, répteis, totalizando mais de 3.695 amostras. Também foram analisados materiais/amostras de mais de 576 espécies de invertebrados. (PINHEIRO et al., 1981b).

Evidenciou-se com este estudo que o VORO é mantido na natureza por meio de dois ciclos distintos, sendo um urbano e o outro silvestre. O homem apresenta-se aparentemente como sendo o único hospedeiro acidental desse arbovírus no ciclo urbano. No ciclo silvestre, foi mostrado que o VORO era mantido na natureza por meio de alguns animais como macacos, bichos-preguiça e provavelmente em pássaros. Em relação ao vetor responsável pela manutenção do VORO no ciclo selvagem, evidências mostraram que o *Aedes (Ochlerotatus) serratus* e o *Coquillettidia venezuelensis*, estão envolvidos nessa transmissão (PINHEIRO et al., 1981b).

No ciclo urbano ou epidêmico o vírus é transmitido de pessoa a pessoa por meio da picada do inseto antropofítico *Culicoides paraensis*, pertencente a família *Ceratopogonidae*, conhecido popularmente na Amazônia brasileira como “maruim”, e em menor escala pelo *Culex quinquefasciatus*, da família *Culicidae*. Insetos do gênero *Culicoides* spp., são amplamente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais das Américas (LINLEY; HOCH; PINHEIRO, 1983), tem hábitos diurno, atuando especialmente no crepúsculo e no final da tarde e apresentam uma grande avidez por sangue humano. Eles se reproduzem preferencialmente em matéria orgânica em decomposição, como troncos de bananeiras, cascas de cacau e de cupuaçú, etc. (HOCH; ROBERTS; PINHEIRO, 1986).

O envolvimento do maruim como transmissor do VORO, sustenta-se com base em estudos experimentais que mostraram a habilidade desse vetor, após se alimentar de sangue de pacientes virêmicos, em transmitir o vírus para os hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), dentro de um intervalo de cinco ou mais dias de exposição (PINHEIRO et al., 1982b). Em tentativas de transmissão do VORO entre hamsters por meio do mosquito *Culex quinquefasciatus*, demonstrou-se que a transmissão do vírus somente ocorria quando os níveis de viremia eram muito altos, o que dificilmente seriam encontrados em humanos naturalmente infectados

(PINHEIRO et al., 1982b). Curiosamente estudos mostraram que a taxa de isolamento do vírus a partir do *Culicoides paraensis* durante períodos de epidemias é de apenas 1:12.500, sugerindo que o maruim, embora seja considerado o principal vetor, seja um vetor de baixa eficiência (LE DUC e PINHEIRO, 1988).

Desse modo, VORO pode ser considerado um agente predominantemente enzoótico entre os animais silvestres, e o elo entre os dois ciclos é o próprio homem que após a contaminação em áreas silvestres enzoóticas regressa em estado virêmico às cidades onde o vírus por meio da ajuda do vetor é capaz de invadir áreas urbanas onde pode causar epidemias de largas proporções (PINHEIRO, 1981b; TRAVASSOS DA ROSA, 1998).

Não se sabe ao certo a duração do período de incubação do VORO, porém estudos realizados durante algumas epidemias sugerem que ele pode apresentar uma variação de quatro a oito dias. Em um incidente, ocorrido com dois técnicos de laboratório, que se infectaram acidentalmente por via respiratória, os mesmos apresentaram sintomas da arbovirose três a quatro dias após a infecção (PINHEIRO et al., 1981a).

2.7 INCIDÊNCIA DO VÍRUS OROPOUCHE

As taxas de incidência do VORO são baseadas, sobretudo em estudos realizados no Brasil. De modo geral, a estimativa da incidência é feita através de inquéritos soropidemiológicos, nos quais grupos familiares são selecionados aleatoriamente; aplica-se um questionário clínico- epidemiológico aos membros de cada família, bem como se obtêm amostras de sangue para a detecção de anticorpos neutralizantes, fixadores do complemento, inibidores de aglutinação e da classe de anticorpos IgM contra o VORO. Cabe ressaltar que nos casos febris, para a realização da tentativa de isolamento viral, são realizadas inoculações em camundongos e em células VERO (VASCONCELOS et al., 1989; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 2004).

Sabe-se que quando ocorre uma epidemia de febre do Oropouche, as áreas urbanas dos municípios não são acometidas de forma homogênea, ocorrendo que alguns bairros apresentam uma incidência maior em relação a outros. Prova disso têm-se os inquéritos sorológicos realizados em Belém, em 1961, que mostraram que

dos 17 bairros estudados, apenas três foram predominantemente afetados pela febre do Oropouche (PINHEIRO et al., 1997). Nas epidemias de 1979 e 1980, a taxa de ataque na população de seis bairros da cidade variou entre 4,8% e 8%, o que permitiu calcular que cerca de 80 mil pessoas haviam sido infectadas pelo VORO (FREITAS et al., 1982; PINHEIRO, 1983; PINHEIRO, 1986).

Na cidade de Manaus, nos anos de 1980 e 1981 encontrou-se uma taxa de anticorpos IH de 15% para o VORO no período pós-epidêmico, o que sugere que aproximadamente 97 mil pessoas foram afetadas pela arbovirose (BORBOREMA et al., 1982).

Embora em algumas epidemias as taxas de incidência não tenham sido determinadas, cabe ressaltar que nas diversas epidemias descritas, o VORO refere um elevado número de pessoas infectadas. Em uma grande epidemia registrada na região leste do Estado do Pará, a proporção de pessoas acometidas e que desenvolveram quadros febris foi de 63%. Contudo, a taxa de incidência média para esse vírus tem sido estimada em 30% (FREITAS et al., 1982).

Com relação à incidência por sexo, as estimativas de acometimento têm mostrado algumas variações. Nas regiões da Zona Bragantina (nordeste do Pará), atingidas em 1979, houve um ligeiro predomínio das taxas em mulheres em relação aos homens, enquanto que em Belém, no mesmo ano, os indivíduos do sexo masculino apresentaram maior incidência (FREITAS et al., 1982). Já nas epidemias ocorridas em Santarém, a infecção foi duas vezes mais freqüente nas pessoas do sexo feminino do que nas do sexo masculino (DIXON et al., 1981). Contudo, cabe ressaltar que todos os grupos etários são atingidos pela arbovirose, embora em alguns surtos a incidência da febre do Oropouche tenha sido maior em adultos jovens e crianças (PINHEIRO et al., 2004).

2.8 SINTOMAS CLÍNICOS E PATOGÊNESE DA FEBRE DO OROPOUCHE

Com base em observações realizadas ao longo dos anos, durante os surtos e epidemias causadas pelo VORO, sabe-se que na maioria dos casos humanos de infecção pelo vírus, a manifestação clínica é referida como uma doença febril aguda com temperaturas que podem chegar a 40°C, sendo denominada de febre do Oropouche. A forma febril clássica é caracterizada por um aumento abrupto da

temperatura após o período de incubação do vírus. De maneira geral a febre é acompanhada de tontura, cefaléia, mialgias, artralguas, calafrios, vertigem, fotofobia, podendo também ocorrer dor retro-ocular e congestão da conjuntiva. Alguns pacientes podem apresentar náuseas às vezes acompanhadas de vômito e diarreia. Outros apresentam um severo quadro de anorexia e insônia. A infecção ainda é caracterizada por mialgia generalizada na nuca, musculatura paravertebral e na região sacral, além de artralgia generalizada e prostração (PINHEIRO et al., 1981a; PINHEIRO et al., 1998).

Certos pacientes queixam-se ainda de ardor passageiro em determinadas partes do corpo, tendo também a ocorrência de exantema em alguns casos. Alguns pacientes sofrem vertigens tão severas que às vezes resultam em queda. Pode haver também epigastia leve, entretanto sem sinal de icterícia, de esplenomegalia ou de hepatomegalia. Por outro lado, ocasionalmente pode haver linfadenomegalias nas regiões occipital e submandibulares. Muitas vezes o quadro pode se tornar bastante incapacitante para o paciente, limitando as atividades do mesmo por vezes em até duas semanas, levando em alguns casos à internação hospitalar (PINHEIRO et al., 1981a; PINHEIRO et al., 1998).

Geralmente a fase aguda da doença dura de 2 a 5 dias, podendo perdurar até uma semana. A mialgia pode permanecer ainda de 2 a 5 dias após o desaparecimento da febre. Em alguns casos os pacientes relatam astenia com duração de até um mês após a melhora dos sintomas gerais. Certos pacientes queixam-se ainda que as cefaléias costumam durar algumas semanas. Entretanto, nenhuma fatalidade ou seqüela permanente foi diretamente atribuída à doença (PINHEIRO et al., 1981b; PINHEIRO et al., 1982b; LE DUC e PINHEIRO, 1986).

Nos casos em que os pacientes manifestam exantema, o que ocorreu em 5% dos pacientes na epidemia de Belém de 1980, dentre os casos confirmados laboratorialmente, este apareceu entre 2 a 3 dias após o aparecimento da febre, acometendo principalmente o dorso, tórax, braços e pernas, desaparecendo 2 a 3 dias depois (PINHEIRO, 1983; PINHEIRO et al., 1986). Isso também ocorreu na epidemia de Manaus (1980), onde muitos pacientes apresentaram exantema máculo-papular, originando-se no dorso e estendendo-se para as extremidades superiores e inferiores (BORBOREMA et al., 1982).

Segundo Freitas et al (1982), uma criança de 4 anos acometida pelo VORO, apresentou tremor generalizado e sonolência, com duração de aproximadamente 8 dias, contudo aparentemente a criança se recuperou totalmente.

Não se sabe ao certo os efeitos da infecção pelo VORO em mulheres gestantes. Os únicos dados disponíveis são de um estudo realizado durante a epidemia de Manaus, onde de nove pacientes grávidas duas que estavam no segundo mês de gestação sofreram aborto (BORBOREMA et al., 1982). Sabe-se também que em mulheres que são acometidas por infecções causadas pelo VORO durante o ciclo menstrual, este se apresentou mais intenso e prolongado do que o habitual (PINHEIRO et al., 1976; PINHEIRO et al., 1981b; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996).

Inúmeros pacientes manifestaram um quadro neurológico típico de meningite asséptica, durante o surto de febre do Oropouche no Estado do Pará em 1980, no entanto os resultados de eletroencefalogramas não demonstraram nenhuma anormalidade em quatro pacientes que realizaram o exame. A incidência de meningite entre os pacientes que procuraram cuidados médicos foi menor que 5% (PINHEIRO et al., 1982a).

Aproximadamente 60% dos pacientes acometidos pelo vírus, apresentam uma ou mais recidivas da doença no decorrer de uma ou duas semanas após o desaparecimento dos sintomas agudos, no entanto estes se apresentaram mais brandos. Neste caso, geralmente os pacientes referem cefaléia e mialgia, acompanhadas de febre baixa e por vezes astenia e vertigem (PINHEIRO et al., 1981b; FREITAS et al., 1982; PINHEIRO, 1983). Em alguns casos, durante as recidivas, após dez dias do término dos sintomas agudos, os pacientes apresentaram infecções bacterianas no trato orofaríngeo e urinário, entretanto o VORO ou outro agente viral nunca foi isolado das recidivas (PINHEIRO et al., 1981b).

O período de incubação após a picada infectante contendo o VORO, em seres humanos, é de 4 a 8 dias, sendo que esses pacientes tornam-se virêmicos já nos dois primeiros dias da doença, o que torna-os possíveis fontes de disseminação do vírus. Ressalte-se, no entanto, todas as tentativas de se isolar o VORO durante as recidivas falharam (PINHEIRO et al., 1981b; PINHEIRO et al., 1998).

Em relação a patogenia da febre do Oropouche, poucas informações são conhecidas. Sabe-se que o agente causa uma infecção sistêmica no ser humano,

com apresentação de uma fase virêmica (PINHEIRO et al., 1981b). De acordo com estudos realizados, em torno de 100% dos pacientes, os títulos virais chegaram até 10^5 a $10^{5,3}$ DL₅₀/0.02 mL nos dois primeiros dias da doença. De fato, todos os pacientes acometidos pelo VORO desenvolveram viremia máxima até o segundo dia da doença, caindo a percentagem no terceiro dia para 72%, sendo no quarto e quinto dia a positividade de cerca de 44 e 23%, respectivamente (PINHEIRO et al., 1981b). Também não existem informações em relação a patogênese nas recidivas da doença, pois em muitos pacientes não há nem sinais de viremia (PINHEIRO et al., 1998).

O fato de o VORO ser capaz de causar meningite asséptica em alguns pacientes sugere que ele tenha a capacidade de ultrapassar as barreiras hematoencefálicas (PINHEIRO et al., 1982a). Alguns achados laboratoriais mostram que durante a febre do Oropouche, comumente é encontrado leucopenia associada com neutropenia, embora em certos casos possa haver leucocitose moderada. A leucopenia pode ser severa com até 2.000 leucócitos por mm³. Os níveis de transaminases são normais, às vezes podendo apresentar aumento moderado, não ultrapassando 135 unidades por mL de soro. A contagem de plaquetas geralmente é normal, com algumas exceções, podendo estar ligeiramente baixas. As taxas de glicose, uréia e creatinina no sangue são normais, bem como os testes sobre densidade e sedimento da urina (PINHEIRO et al., 1981b).

Como não se conhecem fatalidades em decorrência da infecção pelo VORO, não há dados publicados de autópsias sobre possíveis lesões teciduais causadas em humanos por esse patógeno, e, portanto não sabe-se ao certo todos os órgãos em que o vírus se replica em humanos (PINHEIRO et al., 1998).

No entanto, alguns trabalhos, utilizando modelos experimentais em animais, contribuíram imensamente para elucidar alguns aspectos da patogênese do VORO. O primeiro estudo, datado de 1978, desenvolvido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, a inoculação por via intracerebral em hamsters dourados de três semanas de idade, demonstrou que seis horas após a infecção pelo vírus, foi possível detectar lesões no fígado, apresentando importante necrose dos hepatócitos e considerável hipertrofia das células de Kupffer, sugerindo assim, que o vírus utiliza uma via hematogênica para o seu transporte do cérebro até o fígado (ARAÚJO et al., 1978).

Esse estudo experimental sugere ainda que o VORO possa ser capturado por células de Kupffer e ser transferido para hepatócitos, onde se replica, causando dano ao tecido. Entretanto, este estudo não revelou nenhuma partícula viral no tecido hepático analisado por microscopia eletrônica, mesmo que a microscopia tenha mostrado importantes alterações na morfologia celular, tais como hiperplasia do retículo endoplasmático rugoso, formação de viroplasma no citoplasma e marginação da cromatina (ARAÚJO et al., 1978).

Estudos realizados utilizando inoculação por via subcutânea, também em hamster dourados, tentando simular uma infecção natural, demonstraram que o VORO causa viremia e que possui marcante tropismo pelo fígado e cérebro, apresentando altos títulos virais nesses órgãos (PINHEIRO et al., 1982a). Outro estudo realizado também por inoculação por via subcutânea (RODRIGUES et al., 2004), demonstrou que ocorre uma infecção sistêmica, com detecção de altos títulos de vírus no plasma, alcançando um pico de $10^{6,0}$ TCID₅₀/mL no terceiro dia após infecção. Análises histopatológicas mostraram ainda lesões nos tecidos cerebrais e hepáticos, sendo possível detectar altos títulos do vírus nestes órgãos. O achado mais importante desse experimento foi a detecção da presença do antígeno viral em neurônios, por meio da imunohistoquímica. Sabe-se, no entanto que essa pode ser uma particularidade desse modelo experimental animal, abrindo a possibilidade de maiores investigações sobre a neuroinvasividade e neurovirulência do VORO.

Outro estudo sobre a patogênese do VORO com modelo experimental animal, dessa vez utilizando-se camundongos BALB/c recém nascidos, com inoculação do vírus também pela via subcutânea (SANTOS, 2008), mostrou que apareceram sinais clínicos no quinto dia após a infecção, ocorrendo a morte de cerca de 90% dos animais. O título viral nos órgãos dos animais também foi verificado após o sacrifício dos mesmos. Revelou-se uma alta concentração de vírus no cérebro, cujas análises histopatológicas mostraram inflamação das meninges, aparentemente sem encefalite, mas com reações astrocitárias importantes, confirmando o neurotropismo do VORO nesse modelo animal. Por outro lado, a presença do vírus replicante no SNC também foi comprovada por meio da técnica de hibridização *in situ*, dirigida contra RNA(+) virais, que são moléculas intermediárias replicativas presentes somente em células onde está ocorrendo replicação viral.

2.9 DIAGNÓSTICO

2.9.1 Diagnóstico laboratorial

A confirmação do diagnóstico laboratorial do VORO é usualmente realizada por meio do isolamento viral a partir do sangue de pacientes infectados até o quinto ou sexto dia da doença, quando praticamente 100% dos pacientes apresentam viremia. O VORO pode ser isolado do soro de pacientes por meio da infecção via intracerebral de camundongos recém-nascidos (1 a 3 dias de vida), ou de hamsters dourados jovens (duas a três semanas de vida). Isolados virais podem ser obtidos ainda em diferentes culturas de células, tais como HeLa, VERO e BHK. As amostras de sangue precisam ser obtidas, de preferência, nos dois primeiros dias da doença onde a viremia alcança o seu ponto máximo (PINHEIRO et al., 1997).

O diagnóstico laboratorial pode também ser realizado por métodos sorológicos, por meio das provas de fixação do complemento, neutralização, inibição de hemaglutinação e ELISA de captura de anticorpos de classe IgM. O ideal para o sorodiagnóstico para detecção de anticorpo é fazer com amostras pareadas, obtidas durante a fase aguda e de convalescença da doença, pois uma análise positiva para uma única amostra de soro fornece diagnóstico presuntivo de infecção recente pela detecção de anticorpos IgM específicos, sendo necessários ainda que os dados do quadro clínico do paciente sejam compatíveis com a doença para confirmação da infecção (PINHEIRO et al., 1998).

Entretanto, para a preparação dos testes acima, é necessária a manipulação do agente infeccioso, o que segundo as normas de segurança do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* – Atlanta, EUA), somente pode ser feito em laboratórios de biossegurança de nível 3. Sendo assim, em 2001 um estudo realizado em parceria entre o Instituto Evandro Chagas, o Centro de Medicina Tropical da Universidade do Texas (EUA), e o Centro de Pesquisa Médica Naval de Lima (Peru), deu início ao uso de uma nova metodologia para detectar anticorpos para o VORO em soro de pacientes. Realizou-se a clonagem e a expressão da proteína do nucleocapsídeo do vírus em sistema plasmidial-bacteriano, e a proteína recombinante foi usada como antígeno em ensaio de ELISA. Tal ensaio simplificou o método, que agora não mais depende exclusivamente da preparação do antígeno

diretamente do vírus, diminuindo assim os riscos de infecção e contaminação. O estudo mostrou também que o método é eficiente em detectar tanto anticóps IgM, quanto IgG, com alta especificidade de 99,5% e sensibilidade de 95% em substituição do antígeno preparado a partir do vírus *in vivo* (SAEED et al., 2001).

Existem ainda outros métodos para diagnóstico laboratorial do VORO, que são mais rápidos e mais sensíveis do que os testes sorológicos, são os testes moleculares. Além do nested RT-PCR (MORELI et al., 2002), existe o método de RT-PCR em Tempo Real ainda mais sensível, que apresenta níveis de detecção em torno de 10^4 a 10^1 partículas virais/mL, sendo uma ferramenta muito útil para a detecção do vírus e a vigilância da ocorrência de surtos em áreas epidêmicas, pois é possível detectar o RNA do vírus em soro já no primeiro dia das manifestações clínicas da doença (WEIDMANN et al., 2003).

Em 2007, foi publicado um novo ensaio, denominado de *Modified Shell Vial Culture Procedure*, que aumenta a eficiência dos métodos de isolamento e detecção de diferentes tipos de arbovírus em soro de pacientes que tenham uma menor carga viral, o que promete aumentar a sensibilidade dos métodos de detecção do vírus no sangue. Esse procedimento também foi testado com soros de pacientes acometidos pelo VORO, e se mostrou bastante eficiente, mostrando que em altas diluições destes soros ainda era possível detectar o vírus, quando comparado com o método padrão (CACEDA e KOCHERL, 2007).

2.9.2 Diagnóstico diferencial

Rotineiramente, o diagnóstico clínico da febre do Oropouche é difícil devido a natureza inespecífica dos sintomas, fáceis de confundir com outras doenças febris agudas como, dengue, malária, mononucleose, etc. Prova disso é que a dengue e a malária foram suspeitas inicialmente de serem a causa das epidemias de febre do Oropouche. Uma avaliação clínica minuciosa aliada a elementos epidemiológicos detalhados ajudam a estabelecer um diagnóstico diferencial, porém a certeza do diagnóstico somente é conseguida mediante a demonstração de ausência do *Plasmodium* em amostras de sangue (esfregaços de sangue), bem como de evidências laboratoriais descartando a hipótese de ser infecção por dengue. Outras doenças febris, tanto de origem bacteriana como viral, devem ser consideradas no

diagnóstico diferencial. Dados clínicos e epidemiológicos, bem como os exames inespecíficos também devem ser levados em consideração (PINHEIRO et al., 1998).

Nos quadros febris, acompanhadas de exantema deve-se prestar atenção para que possam ser diferenciados de outros quadros febris exantemáticos, por exemplo, aqueles causados pela rubéola, enterovirose e de alergias medicamentosas. Para diferenciar casos de meningite asséptica associados com a infecção pelo VORO, daqueles pacientes portadores de meningite asséptica causada por outros agentes infecciosos, faz-se necessário recorrer ao diagnóstico etiológico específico. No entanto, somente com os exames laboratoriais complementares e específicos para o VORO, será possível alcançar o diagnóstico correto para a febre do Oropouche (PINHEIRO et al., 1998).

2.10 TRATAMENTO

Não existe ainda tratamento específico para a febre do Oropouche. O tratamento utilizado é baseado em repouso do paciente até o desaparecimento das manifestações agudas iniciais da doença, principalmente para evitar a recorrência dos sintomas, pois há suspeitas de que as crises de recorrência sejam mais freqüentes em pacientes que reassumem suas atividades normais, particularmente se elas são extenuantes. Para o combate da febre sugere-se o uso de ácido acetilsalicílico ou outros antitérmicos, e para o alívio da mialgia, cefaléia e artralgia se recomendam o uso de analgésicos comuns. Por vezes, naqueles pacientes que não respondem favoravelmente a esse tratamento, tem-se usado morfina. Recomenda-se ainda a ingestão de bastante líquido, como sucos de frutas e/ou soluções de glicose. Nos casos em que ocorra desidratação intensa, deve-se recorrer à hidratação endovenosa (PINHEIRO et al., 1997).

No entanto, alguns estudos mais recentes têm mostrado resultados relevantes em relação aos efeitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* da ação de diferentes drogas antivirais frente a replicação de importantes vírus do gênero *Orthobunyavirus*, dentre eles do VORO. As drogas Ribavirina, Ácido Micofenólico e Interferon Alfa, foram testadas sendo que somente a última, usada na dose de 100.000UI/mL, apresentou efeito inibitório em relação a replicação do vírus em células Vero, quando analisadas por meio de ensaio de placas, bem como quando testadas em camundongos suíços

recém-nascidos. Entretanto, percebeu-se a inibição da replicação viral apenas 24 horas antes ou 2 horas após a inoculação do vírus na cultura, ou um dia antes de inocular o vírus nos animais testados. Quando a droga foi administrada 3 horas após a inoculação do vírus em camundongos, a mesma não apresentou efeito inibitório. Com isso, sugere-se que essa droga seja eficiente apenas na prevenção e no tratamento precoce da febre do Oropouche (LIVONESE et al., 2006; LIVONESE et al., 2007a, 2007b) .

2.11 PROFILAXIA

Para se evitar, reduzir ou interromper as epidemias de febre do Oropouche a medida mais eficaz consiste no combate ao seu vetor – “maruim” (*Culicoides paraensis*). O combate deverá ser dirigido contra as formas adultas e larvárias do vetor. Levando em conta que o maruim é um inseto de hábitos diurnos, a aplicação ambiental de inseticidas, sob a forma de nebulização térmica ou de aerossóis em ultrabaixo volume (UBV), poderá contribuir para a redução da população adulta dos maruins, mas não das larvárias. Como o período de maior atividade desta espécie é, sobretudo ao fim da tarde, a aplicação de UBV poderá resultar-se a mais apropriada (ROBERTS et al., 1981).

Contudo, faz-se necessário efetuar estudos bem planejados para avaliar o método, bem como estabelecer as condições adequadas para alcançar o máximo de efetividade, incluindo-se aí o tipo e a concentração do inseticida a ser utilizado, o seu volume por área a ser tratada, frequência e intervalo das aplicações. Deve-se também fazer o combate à fase larvária do maruim, sendo esta uma fase muito importante. Isto poderá ser efetuado mediante a aplicação de larvicidas diretamente nos criadouros ou, promover a eliminação dos mesmos (HOCH et al., 1986).

Para que haja o sucesso destas medidas será necessária a participação efetiva da comunidade, daí a importância de se promover a educação apropriada da mesma. A proteção individual pode ser obtida mediante o uso de inseticidas de aplicação na pele, porém a ação dos mesmos é temporária e pode resultar-se onerosa para as populações menos favorecidas. Até o presente momento não existe vacina contra a febre por Oropouche para uso das populações que residem nas áreas de risco de adquirir a virose (PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 2004).

2.12 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E GENÔMICAS DO VORO

Em decorrência da não existência de casos fatais associados a infecção causada pelo VORO não existe, no entanto, estudos específicos de microscopia eletrônica em tecidos humanos para esse vírus. Acredita-se que suas partículas virais assumam morfologia similar aquelas observadas para os demais membros do gênero *Orthobunyavirus*. Os vírus desse gênero são esféricos, medindo de 80 a 120 nm de diâmetro, exibem glicoproteínas de superfície de 5 a 10 nm de projeção, as quais estão inseridas em uma bicamada de lipídios de 5 a 7 nm de espessura, formando o envelope do vírus. Estudos bioquímicos e de microscopia eletrônica do *Orthobunyavirus La Crosse*, sugerem que existem 270 a 1400 espículas de glicoproteínas por partícula viral. Essas espículas são constituídas de heterodímeros das glicoproteínas de superfície Gn e Gc (NICHOL, 2001).

O VORO, como os demais membros dessa família possui RNA tri-segmentado de polaridade negativa, com exceção dos *Phebovirus* e *Tospovirus*, que tem um dos segmentos de RNA ambisenso (NICHOL, 2001). Os segmentos são nomeados de acordo com o seu tamanho: segmento Grande (*Large* – LRNA), Médio (*Medium* – MRNA) e Pequeno (*Small* – SRNA) (SCHMALJOHN e PATTERSON, 2001). Há significativa semelhança entre os *Orthobunyavirus* em relação ao tamanho dos segmentos de RNA, que por sua vez são diferentes daqueles observados para membros de outros gêneros da família *Bunyaviridae* (USHIJIMA et al., 1980).

O genoma do VORO também varia de tamanho conforme o segmento genômico. O segmento PRNA é constituído por 754 nucleotídeos (nt), enquanto que o segmento M possui 4.385 (nt) e o L possui 6.846 (nt), (SAEED et al., 2000; AQUINO et al., 2003; AQUINO e FIGUEIREDO, 2004). Os segmentos de RNA genômicos do VORO apresentam-se ao longo de suas extremidades 3' e 5' ancoradas em regiões não codificantes (RNC), com onze nucleotídeos conservados e complementares, o que proporciona circularização dos segmentos e a conformação helicoidal das moléculas de RNA, gerando um melhor acomodamento espacial no interior da partícula viral (CLERX-VAN HAASTER et al., 1982a; CLERX-VAN HAASTER et al., 1982b; RAJU e KOLAKOFSKY, 1989).

No VORO, o segmento GRNA codifica em uma única cadeia aberta de leitura (CAL), a proteína L, a maior proteína dos *Orthobunyavirus*, uma possível RNA

polimerase-dependente de RNA com massa molecular de 244,6 kDa e que se encontra associada aos três segmentos de RNA viral (AQUINO e FIGUEIREDO, 2004). Em relação ao segmento MRNA, o mesmo codifica em uma única CAL, uma grande poliproteína, que após clivagem origina três proteínas virais, sendo duas glicoproteínas estruturais de superfície denominadas Gn e Gc e uma proteína não estrutural denominada NSm (AQUINO e FIGUEIREDO, 2004). Já o segmento PRNA codifica ao longo de duas CALs superpostas, uma proteína estrutural de nucleocapsídeo (N) que circunda cada um dos segmentos de RNA genômicos, e uma proteína não estrutural denominada NSs (SAEED et al., 2000). Essas proteínas virais estão implicadas em importantes propriedades biológicas dos *Ortobunyavírus*, tais como: antigenicidade - processo que estimula a produção de anticorpos neutralizantes, fixadores de complemento e inibidores da hemaglutinação; virulência - grau de severidade da doença e a infectividade em vertebrados e invertebrados - interação vírus-célula hospedeira (GONZALEZ-SCARANO e NATHANSON, 1996; BOULOY, 1991; BUCHEN-OSMOND, 2003).

2.13 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Com base em estudos genéticos do VORO, foi possível demonstrar que o vírus pertence a um grupo monofilético abrangendo pelo menos quatro linhagens genéticas distintas circulantes nas Américas, denominadas de genótipos I, II, III e IV (SAEED et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2011). Baseando-se nos achados referentes ao seqüenciamento nucleotídico do gene N (PRNA) de 27 cepas do VORO isoladas de diferentes hospedeiros, obtidas ao longo de 42 anos de estudo, abrangendo uma área significativa da América do Sul, foi possível demonstrar que o genótipo I inclui a cepa protótipo inicialmente isolada em Trinidad & Tobago em 1954. Ao genótipo II, pertencem os isolados do Peru, obtidos entre 1992 e 1998, bem como mais duas amostras isoladas no Brasil em 1991. E no genótipo III foram incluídos quatro isolados do Panamá obtidos no ano de 1989. No Brasil dois (I e II) dos três genótipos foram detectados, sendo que a maioria dos isolados do Brasil são do genótipo I, mais frequentemente encontrado no Leste da Amazônia, e o genótipo II em menor quantidade, encontrado no Oeste Amazônico (SAEED et al., 2000).

No ano de 2000, uma nova cepa do *Vírus Oropouche* foi isolada de um novo hospedeiro vertebrado (*Callithrix sp*), no Estado de Minas Gerais, Sudeste do Brasil, sendo esta cepa classificada como genótipo III, encontrada até aquele momento somente no Panamá, sugerindo com isso um possível potencial de dispersão do VORO para regiões populosas e altamente susceptíveis (NUNES et al., 2005b). Outras análises moleculares de cepas adicionais, isoladas durante epidemias ocorridas entre 2003 e 2006 região Bragantina, mais precisamente nos municípios de Igarapé Açu, Maracaná, Magalhães Barata e Viseu, demonstraram a co-circulação dos genótipos I e II e sua associação aos casos de Febre do Oropouche na região (AZEVEDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009), bem como a detecção de um quarto genótipo (genótipo IV) de amostras do VORO isoladas em Manaus (VASCONCELOS et al., 2011).

2.14 CICLO REPLICATIVO

A interação vírus-célula ocorre pela união de proteínas do envoltório do vírus com receptores na membrana celular do hospedeiro (SCHMALJOHN e HOOPER, 2001). Ainda não se sabe muita coisa sobre o ciclo replicativo especificamente do VORO. Alguns estudos feitos com membros da família *Bunyaviridae*, tais como o *Vírus La Crosse*, *Vírus Punta Toro*, *Vírus Hantaan* e o *Vírus Uukuniemi*, têm mostrado que o ciclo replicativo começa com o reconhecimento pelo vírus do receptor específico da membrana plasmática, seguindo-se de endocitose (SANTOS, 2003).

Ainda não foram identificados receptores celulares específicos para a maioria dos vírus dessa família, entretanto, as integrinas β_3 , que são proteínas de superfície encontradas em células endoteliais, foram identificadas como facilitadoras da entrada de alguns hantavírus em células em cultura (GAVRILOVSKAYA et al., 1999).

A interação com o receptor celular é provavelmente mediada pelas glicoproteínas de superfície Gn e Gc, as quais estão intimamente envolvidas com o ciclo replicativo do vírus nas células hospedeiras. Em estudos realizados com o *Vírus La Crosse*, sugeriu-se que a proteína Gc se liga ao receptor das células de mamíferos e Gn se liga as células do inseto vetor (LUDWIG et al., 1991). Entretanto, ainda não foi determinado se ambas as proteínas do envelope são necessárias para a entrada do vírus nas células eucarióticas. No entanto, sabe-se que para o gênero

Orthobunyavirus, a proteína Gc do envelope provavelmente também está relacionada com o processo de fusão de membranas o que possibilitaria a saída do vírus do endossomo e por conseqüência a liberação do mesmo no citoplasma da célula do hospedeiro (SCHMALJOHN e HOOPER, 2006).

Estudos específicos para o VORO, mostraram que a entrada do vírus, tanto em célula HeLa quanto em C6/36, é mediada por endocitose dependente de claritina e ocorre entre 15 a 20 minutos após adsorção. E que em células HeLa I o desnudamento do VORO é dependente de acidificação do endossomo (SANTOS, 2003; SANTOS et al., 2008). No endossomo há a fusão da membrana celular com o envelope viral, e conseqüentemente, ocorre a liberação do ribonucleocapsídeo no citoplasma, o que permite a transcrição primária das fitas de RNA, a qual é realizada pela RNA-polimerase RNA-dependente que vem com o vírus, permitindo a produção de fitas de RNA positivas (mRNA), que serão usadas na tradução de proteínas virais e servirão de molde (cRNA) para a transcrição do RNA viral (vRNA) (SCHMALJOHN e HOOPER, 2006).

A saída da célula hospedeira, dos vírus da família *Bunyaviridae*, ocorre através da membrana do complexo de Golgi, com exceção de alguns membros, tais como os hantavirus *Sin Nombre* e *Black Creek Canal*, que brotam da membrana plasmática (SMITH e PIFAT, 1982; RAVCOV et al., 1997; SCHMALJOHN e HOOPER, 2006).

Estudos realizados com o VORO em culturas de célula HeLa, mostraram que esse vírus possui um ciclo replicativo que dura em média de 22 a 28 horas, apresentando um eficiência replicativa de cerca de 1000 partículas de progênie para cada partícula inicial (SANTOS, 2003). Outro trabalho realizado por Santos (2008), também com células HeLa, mostrou que 10 horas após a inoculação do VORO já ocorre a liberação da progênie, com pico máximo em torno de 24 horas. Outros estudos mostram ainda que vírus da família *Bunyaviridae*, em sua maioria, saem da célula hospedeira por exocitose (SCHMALJOHN e HOOPER, 2006).

Contudo, apesar de o VORO ser de grande importância em saúde pública, pouco se sabe sobre a patogênese a nível molecular, bem como em relação aos aspectos de interação vírus-célula. A maioria dos achados sobre a patogênese a nível molecular dos vírus do gênero *Orthobunyavirus*, advêm de experimentos realizados com o *Vírus La Crosse* – protótipo dos vírus do sorogrupo Califórnia. Sabe-se também que o tropismo tissular entre os membros dessa família é variável, e

isso se deve em parte à distribuição dos receptores de membrana celular, o que pode dar uma característica própria a cada membro dessa família em relação ao seu ciclo replicativo (SCHMALJOHN e HOOPER, 2006).

2.15 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ÀS INFECÇÕES VIRAIS

Primeiramente é importante compreender que o sistema imunológico ou sistema imune é de grande eficiência no combate a micro organismos invasores. Mas não é só isso; ele também é responsável pela “limpeza” do organismo, ou seja, a retirada de células mortas, a renovação de determinadas estruturas, rejeição de enxertos, e memória imunológica. Também é ativo contra células alteradas, que diariamente surgem no nosso corpo, como resultado de mitoses anormais. Essas células, se não forem destruídas, podem dar origem a tumores (ABBAS et al., 2007).

O que acontece de fato é que todas as pessoas nascem com imunidade inata. Os componentes do sistema imunitário que participam na imunidade inata (macrófagos, neutrófilos e sistema do complemento) reagem de forma semelhante perante todas as substâncias estranhas, e o reconhecimento dos antígenos não varia de pessoa para pessoa (PEREIRA, 2011).

Porém, o corpo não combate todos os invasores da mesma forma, por exemplo, os que permanecem fora das células do corpo (organismos extracelulares) são relativamente fáceis de combater; o sistema imunitário mobiliza defesas para facilitar a sua ingestão pelos macrófagos e outras células. Além disso, a maneira de o sistema imunitário levar a cabo esse procedimento depende de os invasores serem capsulados (terem uma cápsula espessa à sua volta) ou não. Os invasores que chegam ao interior das células (organismos intracelulares) e permanecem viáveis (vivos) e funcionais são combatidos de maneira completamente diferente (PEREIRA, 2011).

É nesse aspecto que os linfócitos T fazem parte do sistema imunitário de vigilância, pois contribuem para identificar antígenos, que são substâncias estranhas ao corpo, porém, para ser reconhecido por um linfócito T, um antígeno deve ser processado e apresentado ao linfócito de forma tal que este o possa identificar, como destaca Pereira (2011 p. 43) a seguir:

1. Um antígeno que circula pelo corpo tem uma estrutura que um linfócito T não pode reconhecer.
2. Uma célula processadora de antígenos, como um macrófago, rodeia e ingere o antígeno.
3. As enzimas da célula processadora de antígenos partem o referido antígeno até o reduzir a fragmentos.
4. Alguns fragmentos de antígeno ligam-se a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade e são lançados para a superfície da membrana celular.
5. Um receptor de células T, localizado na superfície de um linfócito T, reconhece o fragmento de antígeno ligado a uma molécula do complexo maior de histocompatibilidade e adere a ele.

As células do sistema imune são altamente organizadas, atuando cada uma segundo sua função. Entre as células que integram este sistema podemos encontrar os leucócitos ou glóbulos brancos, que são divididos em diferentes tipos, com funções imunológicas distintas. São eles: linfócitos, neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos e monócitos (GUYTON, 2004). Por sua vez, os linfócitos são classificados em dois tipos: os linfócitos T e linfócitos B.

Os linfócitos T, segundo Filho (1985), são responsáveis pela imunidade celular, podendo ser linfócitos T4 – conhecidos também como células CD4 – ou auxiliaadoras, sendo o elemento vigilante que alerta o sistema imune para a necessidade de lutar contra o “visitante indesejado” através da síntese de substâncias químicas – citocinas e os linfócitos T8 – ou células CD8 citotóxicas – que são aquelas que destroem as células que se encontram infectadas.

A resposta imune é de fundamental importância na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com alto índice de mortalidade. É também conhecido o fato de que, para a quase-totalidade das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições, via sistema imune, de destruir esses micro organismos e impedir a progressão da infecção (MACHADO et al., 2004).

Em contraste, as deficiências imunológicas, seja da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas e deficiência de complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de anticorpos ou deficiência da função de células T), são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (JANEWAY C.A JR, 2001).

Mesmo sabendo que a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, têm sido acumuladas nos últimos anos evidências de que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal (STITES et al., 2000). Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada que tem como consequência dano tecidual. Em outros casos, agentes infecciosos, seja por mimetizar antígenos próprios, por induzir proliferação de células auto-reativas ou por aumentar nas células infectadas a expressão de moléculas de MHC e moléculas coestimulatórias, podem desencadear doenças auto-imunes (COOKE et al., 2004).

Atualmente as doenças virais não só são comuns, como representam uma das mais importantes doenças infecciosas associadas com a mortalidade da população em todo o mundo. Como todos os patógenos os vírus compartilham a qualidade de serem imunógenos complexos, capazes de replicação, que estimulam no hospedeiro, variadas respostas imunológicas, tanto celulares quanto humorais. (MACHADO et al., 2004; TRISTRAM et al., 2004).

Em decorrência dos múltiplos mecanismos de defesa imunológica contra os vírus, grande parte das infecções virais é assintomática ou tem uma apresentação subclínica com manifestações inespecíficas, como febre e rash cutâneo. Todavia, várias infecções virais progridem, e dano tecidual importante pode ocorrer. A patologia associada à infecção viral pode estar relacionada com um efeito citopático do vírus, reação de hipersensibilidade e fenômenos auto-imunes. Em muitas infecções virais a destruição de célula acontece por mais de um desses mecanismos. Por exemplo, na infecção pelo *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV) e nas infecções pelo vírus B e vírus C da hepatite, a destruição da célula infectada é mediada tanto pelo efeito citopático do vírus como através de citotoxicidade por células *natural killer* (NK) e células CD8. Algumas infecções virais exemplificam bem a ampla dimensão dos mecanismos de agressão tecidual que ocorrem no curso dessas infecções (JANEWAY, 2001; COOKE et al., 2004).

Quando um hospedeiro vertebrado é infectado por um vírus, o sistema imunológico deste hospedeiro monta um número variado de respostas. Muitas destas envolvem a produção de anticorpos específicos contra antígenos expressos pelo patógeno via sistema imune adaptativo, com envolvimento de células T CD4,

CD8 e linfócitos B (SCHMALJOHN e HOOPER, 2006). Contudo, o hospedeiro também desenvolve uma resposta não específica, rápida e bastante eficiente, que é de suma importância no início da invasão. Tal resposta constitui a primeira linha de defesa do organismo e é marcada pela produção das citocinas (ABBAS et al., 2007).

Essa resposta imune primária envolve citocinas como os IFN- α e IFN- β (*interferons*) e o TNF (*tumor necrosis factor*). O sistema complemento e as células especializadas em fagocitose, tais como macrófagos e células NK também estão envolvidas nessa reação imune. Essa resposta genérica a diferentes patógenos, denominada de resposta imune inata, ao contrário do sistema imune adaptativo mencionado anteriormente, não confere uma proteção duradoura ao hospedeiro, mas sim uma proteção imediata e inicial extremamente importante contra a infecção (EVERETT e MCFADDEN, 1999; CHADHA et al., 2004).

2.16 CITOCINAS

As citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos secretados pelas células da imunidade tanto inata quanto adaptativa, que formam um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células, medeando o desencadeamento das respostas imunes. Elas são produzidas em resposta a micro organismos e outros antígenos, e diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e na inflamação (ABBAS et al., 2007). Essas moléculas são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune do hospedeiro frente a uma infecção (SHER et al., 1992). São também proteínas extremamente potentes, iniciam sua ação através da ligação a receptores específicos, provocando alteração da síntese do RNA e de proteínas de diferentes células do organismo. A maioria das citocinas exerce efeitos parácrinos (ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras da citocina) ou efeitos autócrinos (ação sobre o tipo celular que a produz). Além disso, algumas citocinas exercem efeitos endócrinos, são secretadas para a circulação, agindo sobre células presentes em outros locais que não os da célula produtora daquela citocina, ou seja, com efeitos de sua ação à distância (SHEERAN e HALL, 1997).

Embora diversos tipos celulares possam secretar citocinas, células T, macrófagos e células dendríticas são as principais fontes produtoras de citocinas. Entre as atividades fisiológicas das citocinas, se destacam a ativação da resposta imune celular e humoral, regulação da hematopoiese e controle da proliferação e diferenciação celular (Quadro 1). Durante a resposta imune celular adaptativa ocorre intensa produção de citocinas, porém vale ressaltar que a produção de citocinas não depende do antígeno, ou seja, não é antígeno-específica, portanto, as citocinas agem sobre qualquer tipo celular que tenha o receptor apropriado (ROSSI e ZLOTNIK, 2000).

Quadro 1 - Principais citocinas, suas células produtoras e principais alvos celulares e efeitos biológicos.

Citocina	Células produtoras	Alvos e efeitos biológicos
1 - Citocinas Pró-inflamatórias (Th1)		
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e células T	Células endoteliais: ativação (inflamação, coagulação) Neutrófilos: ativação Hipotálamo: febre Fígado: síntese de proteínas de fase aguda Músculo, gordura: catabolismo (caquexia) Muitos tipos celulares: apoptose
IL-1 β	Macrófagos, células endoteliais, algumas células epiteliais	Células endoteliais: ativação (inflamação, coagulação) Hipotálamo: febre Fígado: síntese de proteínas de fase aguda
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Células T: diferenciação de Th1 Células NK e células T: síntese de IFN- γ , atividade citolítica aumentada
IFNs do tipo I (IFN- α , IFN- β)	IFN- α : macrófagos IFN- β : fibroblastos	Todas as células: estado antiviral, expressão de MHC de classe I aumentada Células NK: ativação
IFN- γ	Células T (Th1, células T CD8+, células NK)	Macrófagos: ativação (funções microbidas aumentadas) Células B: troca de isótipo para subclasses de IgG Células T: diferenciação de Th1 Expressão aumentada de moléculas MHC de classe I e II, processamento e apresentação de antígenos para células T aumentados
IL-6	Macrófagos, células endoteliais, células T	Fígado: síntese de proteínas de fase aguda Células B: proliferação de células

		produtoras de anticorpo
IL-2	Células T	Induz proliferação de células T e B ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação-apoptose
IL-8 (CXCL8)	Monócitos, Macrófagos, Fibroblastos e Células endoteliais	Promove o recrutamento de neutrófilos, células T e basófilos (potente agente quimiotático)
2 - Citocinas reguladoras (Th2)		
IL-10	Macrófagos, células T	Macrófagos, células dendríticas: inibição da produção da IL-12 e expressão de co-estimuladores e moléculas de MHC da classe II Inibição da proliferação de células Th1
IL-4	Células T CD4+, mastócitos	Células T: diferenciação de células Th2, proliferação Células B: Troca de isótipo para IgE Macrófagos: Inibição da ativação mediada por IFN- γ Mastócitos: proliferação (<i>in vitro</i>)
IL-5	Células T CD4+	Eosinófilos: ativação, produção aumentada Células B: proliferação, produção de IgA
3 - Citocinas moduladoras (Th17)		
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17
IL-17	Células T CD4+, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais

IL, Interleucina; IFN, interferon; TNF, Fator de Necrose Tumoral; TGF, Fator de Crescimento e Transformação; Th1, células T auxiliar tipo 1; Th2, células T auxiliar tipo 2, Th17, células T auxiliar produtoras de IL-17, Treg, células T reguladoras; Adaptada de Abbas 2007. Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 580 p. 6a Edição.

As citocinas apresentam um importante papel na polarização da resposta imune e na manutenção e diferenciação das células. Citocinas como IFN- γ , IFN- α , IL-6, IL-12, IL-18 e linfotoxinas estão envolvidas na polarização de resposta Th1 (pró-inflamatória), promovendo a imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares. Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 estão envolvidas na polarização de resposta Th2 (regulatória), predominante em reações alérgicas e também em respostas humoral e celular contra helmintos, parasitas e patógenos extracelulares (ABBAS et al., 1996).

Atualmente, outras subpopulações de linfócitos T foram descritas de acordo com a sua atividade e padrão de produção de citocinas: linfócitos Th3,

caracterizados pela produção de TGF- β , associados a um perfil modulador da resposta imune; linfócitos T CD4+ CD25+ produtores de TGF- β e IL-10, também chamados de células T reguladoras (Treg), devido a sua capacidade de supressão da resposta imune; e células Th17, caracterizadas pela produção de IL-17 e associadas a um perfil modulador (ANSEL, LEE e RAO, 2003; RONCAROLO et al., 2006). Tendo ainda citocinas como IL-2, IL-7 e IL-15, as quais são importantes no desenvolvimento e manutenção de células T de memória (SCHLUNS e LEFRANCOIS, 2003).

Outros fatores também estão envolvidos nessa diferenciação e indução da respostas Th1, Th2 e Th3, tais como: fatores genéticos, sinais co-estimulatórios e a natureza do estímulo antigênico. Entretanto cabe ressaltar que o fator que mais influencia a resposta inflamatória é o tipo de mediador inflamatório, como citocinas e quimiocinas, presentes no microambiente das células T durante a apresentação do antígeno e do início da resposta mediada por células (D'AMBROSIO e SINIGAGLIA, 2000).

Devido ao grande papel das citocinas na polarização e manutenção de respostas imunes, elas estão diretamente associadas com as patologias resultantes de infecções por microorganismos como os vírus por exemplo (ABBAS et al., 2007).

2.17 RESPOSTA IMUNE CITOCINICA À INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS

Não existem estudos específicos referentes à resposta imunológica mediada por citocinas em humanos ou animais acometidos pelo *Vírus Oropouche*, contudo estudos específicos têm sido realizados buscando investigar a resposta imune imediata (citocínica) em modelos experimentais, culturas celulares, bem como em soros de pacientes acometidos por outros arbovírus, principalmente aqueles pertencentes à família *Flaviviridae*, como por exemplo, o *Vírus da dengue* (VDEN), *Vírus da febre amarela* (VFA), *Vírus bursuquara* (VBSQ), *Vírus rocio* (VROC) e o *Vírus encefalite Saint Louis* (VESL) (QUARESMA et al., 2006; BARROS et al, 2009; BARROS et al., 2011). Muitos desses trabalhos buscam investigar/conhecer especificamente o papel das citocinas e quimiocinas na resposta imune dos pacientes acometidos por essas arboviroses.

No caso da Dengue, observações feitas por vários grupos de pesquisa forneceram indícios do papel patológico de componentes da resposta imunológica ao vírus. O VDEN infecta monócitos, macrófagos e células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos e podem produzir diferentes citocinas quando infectadas. Dentre as citocinas pró-inflamatórias (perfil Th1) encontradas *in vivo* e *in vitro*, pode-se destacar o TNF- α , onde altos níveis dessa citocina em soro de pacientes com febre do Dengue (FD) e febre hemorrágica do Dengue (FHD) sugerem o seu papel fundamental no choque séptico (VITARANA et al., 1991; HOBBER et al., 1993; BRAGA et al., 2001; NGUYEN et al., 2004; CHAKRAVARTI e KUMARIA, 2006).

Desde então vários estudos encontraram elevados níveis de TNF- α em soro de pacientes com FD e FHD, demonstrando a grande expressão desta citocina em pacientes acometidos pelo *Vírus da dengue* (HOBBER et al., 1993; KRAKAUER et al., 1995; PINTO et al., 1999; NGUYEN et al; 2004; CHAKRAVARTI e KUMARIA, 2006; REIS et al; 2007); altos níveis dessa citocina também estão diretamente correlacionados com as manifestações hemorrágicas dessa doença (BRAGA et al., 2001).

Elevados níveis de IL-6, têm sido encontrados em soros de pacientes com FHD/SCD, e vários autores correlacionam a presença elevada dessa citocina com a gravidade da doença (JUFFRIE et al., 2001; AVILA-AGUERO et al., 2004; CHEN et al., 2006). Níveis significativamente elevados de IL-6 foram encontrados em recém nascidos com infecção fatal, sendo também esta citocina fortemente associada com a ativação da via extrínseca de coagulação nos casos de FHD e Síndrome do choque do dengue (SCD) (NGUYEN et al., 2004)

Altos níveis de IL-10 e IFN- γ , têm sido relatados em pacientes com FD e FHD, propondo-se que a geração de citocinas reguladoras (perfil Th2), também estará ocorrendo na tentativa de balancear/controlar a inflamação (NGUYEN et al., 2004; AZEREDO et al., 2001).

Altas concentrações de IFN- α , tanto em pacientes com FD quanto com FHD, também já foram descritas, porém seu papel na gravidade ou controle da doença ainda não foi totalmente elucidado (KURANE, 1993). Sabe-se que o IFN- α é uma citocina que pode induzir resistência aos vírus por ativar vias intracelulares não citolíticas, que atenuam a infecção por meio da limitação da dispersão viral

(GRANDVAUX et al., 2002). Estudos demonstraram que os IFNs α e β protegem as células contra o VDEN em infecções experimentais *in vitro* por que tem a capacidade de inibir a infecção pelo vírus, por prejudicar significativamente a produção ou a estabilidade do RNA viral, do antígeno viral intracelular, e dos vírus secretados para o sobrenadante da cultura celular (DIAMOND et al., 2000), e que o IFN- α limita a replicação do VDEN no sistema nervoso central de camundongos (*in vivo*) (SHRESTA et al., 2004). Entretanto, contrariando as hipóteses do papel protetor do IFN- α em infecções pelo VDEN, pesquisadores demonstraram que esse vírus tem a capacidade de escapar do sistema imunológico através da inibição da via de expressão do IFN- α e que outros flavivírus utilizam o mesmo mecanismo de escape (LIN et al., 2004; FOY et al., 2005).

Nos casos graves de febre amarela, o dano endotelial, a microtrombose, a coagulação intravascular disseminada (CID), a anóxia tissular e o choque, também parecem estar associados a altos teores de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos (FIGUEIREDO, 2006). Outros trabalhos realizados por Quaresma et al (2005), mostram também que em casos de febre amarela fatal em humanos o TNF- α foi mais intensamente expresso no lóbulo na região médio-zonal, seguidos pelas zonas 1 e 3, com imuno-expressão extracelular e em células de Kupffer. Nos espaços-porta essa citocina foi encontrada principalmente em células com morfologia de macrófagos. O IFN- γ também foi detectado, no entanto esta citocina apresentou uma predileção pela zona 2. Sua localização foi tanto extracelular como em linfócitos. Nos espaços-porta, a expressão celular foi mais discreta que no lóbulo hepático.

Outros estudos, também sobre casos fatais em humanos ocasionados pelo VFA, mostraramo escasso fenômeno inflamatório associado à necrose medio-zonal e presença dos corpúsculos de Councilman – Rocha Lima em hepatócitos, é sugerido pela presença de altos teores de TGF- β , citocina indutora de apoptose, no tecido hepático, seguida também por TNF- α e IFN- γ que aparecem juntos em alterações vasculares (especialmente o baixo-fluxo de sangue). Esses dados demonstram que essas citocinas parecem ser responsáveis pelo “jogo” de alterações histopatológicas observadas em casos fatais de Febre Amarela (QUARESMA et al., 2006a; QUARESMA et al., 2006b). Estes dados também reafirmam o papel do TGF- β como regulador de outras citocinas pró-inflamatórias e

corroboram a idéia de que, mesmo que vindo de uma mesma família, os vírus podem agir de maneira diferente sobre o sistema imune do hospedeiro, expressando ou regulando diferentes citocinas (BARROS et al., 2009).

Uma pesquisa de anticorpos contra arbovírus, incluindo o VFA, na forma vacinal (17D), em uma amostra da população de Rio Branco, durante 6 meses, sendo 3 meses antes e 3 meses após a aplicação da vacina, evidenciou que as respostas sorológicas foram do tipo primária, exceto em 21,7% (23/106) dos 17D-positivos (agosto de 1999) e que foi secundária para dois ou mais flavivírus. Comprovou-se ainda que 3 meses após a aplicação da vacina esse percentual subiu para 89,7%, porém os soropositivos tiveram os mesmos resultados sorológicos anteriores. No mesmo estudo, detendo-se ao resultado de anticorpos contra os arbovírus, incluindo VORO, foi inferior a 6%. Observando ainda que após a vacina a soroconversão para o VORO foi de 1.1 (TAVARES-NETO et al., 2004).

Silva et al (2010), investigaram a eficácia da vacina 17D com foco em febre amarela, com amostra de sangue total *in vitro*, o qual obtiveram na análise do padrão de citocinas intracitoplasmáticas, o aumento dos níveis de IFN- α , TNF- α , IL-4 e das células NK. Por outro lado, na presença do estímulo antigênico da vacina 17D, a análise de células T CD8 revelou aumento dos níveis de IL-4 e IL-5. Para as citocinas de células B, o perfil demonstrado foi do aumento dos níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10.

Ainda no mesmo estudo Silva et al (2010), detectaram a presença de linfócitos T CD4 dos pacientes, apresentando percentuais de aumento da IL-12 e IL-5. A análise dos linfócitos T CD8, revelaram aumento dos níveis de IL-12 e TNF- α , além de um aumento nos níveis de IL-4 e IL-5 como já citado. Assim, foi evidenciado que pacientes, após a vacina 17D, apresentam padrão de citocinas exacerbado com uma frequência maior para citocinas de células positivas, principalmente observadas no interior das células NK, Células T CD8, e linfócitos B, independentemente das condições experimentais em que foram avaliados (sob o controle negativo ou com o estímulo da vacina 17D).

Estudos realizados por Barros et al (2009), onde infectaram macrófagos de camundongos com alguns flavivírus, tais como VFA, VBSQ), VROC e o VESL, mostraram que na infecção por VBSQ, VFA e VESL, o IFN- α teve sua produção aumentada 24 horas após a infecção (p.i), enquanto que o VROC provocou o

aumento de IFN- α , somente 48 horas p.i., quando comparado com células não infectadas. Por outro lado nenhum dos vírus testados alterou, por si só a produção das citocinas IL-1 β , TNF- α e TGF- β nas culturas de macrófagos. IFN- α e β são conhecidos como IFNs do tipo I e estão associados como mediadores da resposta imune inata inicial a várias infecções virais. Eles apresentam propriedades biológicas diversas, incluindo efeitos antivirais e imunomoduladores (PLATANIAS et al., 1996; STARK et al., 1998). A importante contribuição de IFN- α e - β para a modulação da infecção por flavivírus tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo* (VITHANOMSAT et al., 1984; HASEGAWA et al., 1990; PINTO et al., 1990; HOOFNAGLE, 1994). Assim, o importante papel de regulador do vírus realizado pelo IFN- α pode explicar o porque que a infecção de macrófagos pelo VDEN, em culturas celulares, só ocorre quando essas células são submetidas a grandes doses de vírus (BARROS et al., 2009).

O TGF- β , sendo uma citocina de ação reguladora, tem um papel importante como inibidor de vários efeitos induzidos por outras citocinas, como IL-1 e TNF- α . Ela é considerada uma citocina essencial para o balanço da resposta imune (WAHL et al., 1989; DINARELLO, 1994). Ainda de acordo com os achados de Barros et al (2009), os macrófagos infectados com os flavivírus e não ativados/estimulados, não apresentaram alterações na produção de TGF- β . No entanto, quando os macrófagos foram infectados com VFA, VROC e VESL e estimulados com lipolissacarídeos (LPS), uma significativa inibição na síntese do TGF- β foi observada 48 horas após a infecção. Apenas a infecção pelo VBSQ foi incapaz de reduzir a síntese de TGF- β por macrófagos estimulados por LPS.

Todos esses estudos realizados e seus respectivos resultados obtidos, mostram o quão importantes são estudos dessa natureza, para contribuir para a elucidação das respostas imunes em pacientes acometidos por arboviroses. No entanto, cabe ressaltar que são desconhecidas pesquisas similares já realizadas, buscando investigar as reações/respostas imunológicas citocínicas em pacientes acometidos especificamente pelo VORO.

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, tem aumentado muito o interesse pelo entendimento de doenças com quadros febris agudos, em virtude de sua alta taxa de acometimento e pouco conhecimento dos seus mecanismos imunofisiopatológicos (QUARESMA, 2003; QUARESMA et al., 2005). Dentre elas, destacam-se aquelas cujos agentes biologicamente agrupados como arbovírus podem induzir doenças em humanos com quadro clínico grave (ISHAK et al., 1982).

A febre do Oropouche, doença febril aguda, causada pelo *Vírus Oropouche* (VORO) é freqüentemente destacada como um exemplo de arbovirose emergente, cuja frequência de casos tem crescido consideravelmente, principalmente no Brasil, e em especial na Região Amazônica (GIBBONS, 1993; NUNES et al., 2005; AZEVEDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011).

Segundo registros, é a segunda causa mais freqüente de arbovirose urbana do país, depois da dengue (CRUZ et al., 2009). No entanto, o verdadeiro impacto do VORO na Amazônia brasileira deve ser ainda maior, pois o caráter inespecífico da doença febril pode levar a subestimar a sua real frequência (PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 2004).

As constantes migrações humanas entre áreas endêmicas e não endêmicas, o desmatamento de grandes áreas de florestas e a proliferação de vetores artrópodes potenciais nos centros urbanos tem contribuído para a ocorrência de surtos e epidemias do VORO nessa região do país (VASCONCELOS et al., 2001).

Considerando esses aspectos, em associação com o pouco conhecimento da imunopatogenia da febre do Oropouche, bem como das particularidades de seu quadro clínico, demonstra-se a necessidade de novos estudos sobre o VORO, principalmente em relação às reações/respostas imunológicas em humanos mediadas por citocinas, que são praticamente desconhecidas. Diante dessa situação é que se justificou a realização da presente pesquisa, buscando descrever/caracterizar o perfil da resposta imune citocínica em humanos acometidos pelo VORO, contribuindo assim, para o melhor entendimento da evolução da infecção, bem como abrindo novas perspectivas para futuras intervenções terapêuticas que possam minimizar o quadro clínico da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil da resposta imune citocínica em infecção humana associadas ao *Vírus Oropouche*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-12, TNF- α , IFN- α e IFN- γ), reguladoras (IL-4, IL-5, IL-10) e moduladoras (IL-17A, IL-23), no soro de pacientes com infecção confirmada pelo VORO;
- Caracterizar o perfil pró-inflamatório, regulador e/ou modulador da resposta imune apresentada pelos pacientes com febre do Oropouche;
- Associar o perfil de resposta imune citocínica encontrada (pró-inflamatória, reguladora e moduladora) com a sintomatologia apresentada ou relatada pelos pacientes com febre do Oropouche;

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Este projeto de pesquisa foi realizado utilizando um total de 320 amostras de soros humanos, sendo que essas amostras foram assim caracterizadas:

1º Grupo: Grupo controle (Controle negativo): Um total de 60 amostras de Banco de Sangue, fornecidas pela Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA) sob ofício nº 080/2011 – GAPRE/HEMOPA, em anexo. Sendo essas amostras isentas de qualquer tipo de infecção, de acordo com os testes/parâmetros realizados pelo HEMOPA, sendo totalmente aptas para doação de sangue e colhidas mediante consentimento/aceite do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), por parte dos pacientes doadores.

Cabe destacar que estas amostras serviram para a montagem do perfil panorâmico de citocinas de cada indivíduo e a construção da curva ascendente da assinatura de citocinas, revelando as frequências de altos produtores de citocinas do Grupo Controle, que serviu sempre como referencial para a análise dos demais grupos envolvidos neste estudo.

2º Grupo: Composto por 260 amostras provenientes de pacientes acometidos por surtos do vírus Oropouche, ocorridos nos municípios de Magalhães Barata (PA) em 2006 e Mazagão (AP) em 2009. As alíquotas desse material, gentilmente cedido pelo Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, se encontravam armazenadas na soroteca da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas desse Instituto, conservadas a -80°C, e assim permaneceram até o momento da sua análise via experimento.

Os indivíduos incluídos neste segundo grupo foram selecionados dentre as amostras viáveis, colhidas durante os surtos seguindo alguns critérios de inclusão, tais como: tempo de doença; apresentação ou não de sintomas específicos para a infecção pelo VORO; amostras pareadas, ou seja, coletadas em dois períodos distintos com média de uma semana de intervalo entre as coletas, dentre outras. Posteriormente essas 260 amostras foram classificadas/subdivididas em oito subgrupos, com base nas características clínicas e/ou laboratoriais apresentadas por estes pacientes, como vemos a seguir:

1. **Não respondedores** - pacientes que tiveram diagnóstico negativo (soro-negativos pelo teste de IH) na primeira coleta do sangue em campo. Grupo composto por 81 indivíduos/amostras.
2. **Não Respondedores Assintomáticos** – indivíduos que tiveram diagnóstico negativo na primeira coleta (soro-negativos pelo teste de IH), e que não apresentavam sintomas clínicos da doença. Esse grupo foi composto por 33 indivíduos/amostras (Subdivisão do grupo dos Não respondedores).
3. **Não Respondedores Sintomáticos** - pacientes que tiveram diagnóstico negativo (soro-negativos pelo teste de IH) na primeira coleta. No entanto apresentavam sintomas clínicos, específicos para o VORO, sendo neste estudo considerado os quatro sintomas mais apresentados pelos pacientes (febre, calafrios, cefaléia e tontura). Esse grupo foi composto por 48 indivíduos/amostras (Subdivisão do grupo dos Não respondedores).
4. **Respondedores precoces** - pacientes que tiveram diagnóstico positivo para o VORO já na primeira coleta do sangue em campo (soro-positivos precoces). Esse grupo foi composto por 99 indivíduos/amostras.
5. **Respondedores tardios** – pacientes que tiveram diagnóstico positivo somente na segunda coleta de sangue e que eram negativos quando da primeira coleta do material biológico em campo (soro-positivos tardios). Esse grupo foi composto por 30 indivíduos/amostras.
6. **Respondedores precoces prolongados** - indivíduos que tiveram diagnóstico positivo tanto na primeira quanto na segunda coleta de sangue em campo. Esse grupo foi composto por 50 indivíduos/amostras.
7. **Respondedores baixos produtores de anticorpos** - Grupo com sorologia/titulação confirmada para o VORO, sendo àqueles indivíduos que apresentaram titulação de anticorpo inibidores da hemaglutinação para ≤ 320 (valor decorrente da diluição seriada do soro 1: 320, no teste de IH, o que caracteriza o Título de anticorpos na amostra) (Subdivisão do grupo dos respondedores precoces).

8. **Respondedores altos produtores de anticorpos** - representados por indivíduos que apresentam títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação para ≥ 640 (Título de anticorpos – diluição 1: 640) (Subdivisão do grupo dos respondedores precoces).

As 260 amostras, obtidas decorrentes dos surtos do VORO, tiveram seu diagnóstico confirmado, para a infecção viral, por meio de testes laboratoriais de: Sorologia - Inibição da Hemaglutinação (IH) e MAC Elisa – detecção de anticorpos IgM e IgG; Isolamento Viral e Transcrição Reversa-Reação de Cadeia de Polimerase (RT-PCR), acrescidos do diagnóstico clínico, realizados pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

5.2 OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS

Mediante revisão de prontuários clínicos dos pacientes, foram obtidos dados sobre as seguintes variáveis: idade, sexo, tempo de duração da doença, principais manifestações clínicas, dentre outras, apresentadas/relatadas pelos pacientes.

Dos 260 pacientes/amostras com febre do Oropouche, optamos por investigar os sintomas clínicos específicos de febre do Oropouche dos 99 indivíduos pertencentes ao grupo dos respondedores precoces (subgrupo 4). Cabe ressaltar que optamos por padronizar esse grupo tanto para obtenção dos dados de sintomatologia como para os dados sorológicos (que serão apresentados em seguida), por este grupo ser bem representativo em número de indivíduos, bem como ter sido formado por pacientes que tiveram diagnóstico positivo já na primeira coleta do sangue e que apresentaram a sintomatologia característica para a infecção pelo VORO.

Dentre a sintomatologia apresentada foi analisada a frequência (%) dos sintomas, conforme descritos no Quadro 2, a seguir:

Quadro 02: Frequência dos sintomas/sinais clínicos específicos apresentados pelo grupo dos respondedores precoces diante a infecção pelo VORO.

SINTOMAS/SINAIS CLÍNICOS	FREQUÊNCIA (%)
Febre	87
Calafrios	72
Cefaléia	61
Tontura	54
Mialgia	48
Fotofobia	39
Nauseas	34
Vômitos	33
Artrite	18
Epigastria	8
Exantema	4
Diarréia	0
Cong. Conjuntival	0

5.3 DADOS SOROLÓGICOS

Os dados sorológicos foram obtidos por meio da revisão dos testes de sorologia para detecção de anticorpos IgM e IgG, realizados nas amostras do grupo dos respondedores precoces (subgrupo 4 padronizado conforme descrito anteriormente). Dessa forma foi possível a quantificação desses dados sorológicos, mediante a positividade para os anticorpos pesquisados, variando sua titulação em relação ao número de indivíduos conforme descritos na Quadro 3.

Quadro 03: Dados sorológicos/titulação de anticorpos inibidores de hemaglutinação, apresentados pelo grupo dos respondedores precoces diante a infecção pelo VORO.

TITULAÇÃO SOROLÓGICA	NÚMERO DE INDIVÍDUOS
20	2
80	3
160	10
320	25
640	32
≥1.280	27

*Altos produtores (640 - ≥1.280), Baixos produtores (20 - 320).

Em seguida os indivíduos que apresentaram titulação viral positiva para o VORO foram divididos em Baixos produtores – sendo àqueles que apresentaram titulação de anticorpo ≤ 320 , e Altos produtores – indivíduos que apresentam títulos de anticorpos ≥ 640 .

A obtenção dos dados clínicos (Tabela 02) e dos dados de dosagem sorológica antígeno específica (IgM e IgG) (Tabela 03), foi de suma importância para fazer as correlações necessárias para o esclarecimento da interação entre as respostas imunes observadas pela dosagem da expressão das citocinas (painel de citocinas estudadas), com a sintomatologia clínica específica e com os dados sorológicos apresentados pelos pacientes que fizeram parte deste estudo.

5.4 DETECÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a realização dessa etapa da pesquisa contou-se com a parceria instituída entre o Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua – Pará e o Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz/SVS/MS, Belo

Horizonte - Minas Gerais, onde foram realizadas as dosagens de citocinas nos soros do sangue dos pacientes/amostras utilizadas no presente estudo. Tal parceria foi de suma importância para a elaboração dessa etapa, uma vez que o CPqRR apresenta uma das melhores infra-estruturas e conhecimento/apoio especializado do país em relação a essa técnica de dosagem de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo, adotada em nossa pesquisa.

5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os níveis plasmáticos das citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- α , IFN- γ e TNF- α), dos soros dos pacientes selecionados para essa pesquisa, foram dosados/quantificados utilizando-se o kit/sistema Cytometric Bead Array (CBA) (BD, Pharmingen, EUA), com metodologia adaptada de TARNOK (2003), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas e recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas, que são detectadas no canal FL3 ou FL4. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de várias citocinas no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra (25 μ l).

Alíquotas de soros ou plasmas e alíquotas dos padrões de citocinas humanas foram submetidas à diluição seriada com tampão diluente G (reagente específico do kit CBA). Após a preparação das amostras e padrões, essas alíquotas (25 μ l) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon Nº 2052). A cada tubo foi adicionado 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anticitocinas específicas anti-IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- α e IFN- γ (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit) ou anti-IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-23 e TNF- α (Human Inflammation CBA Kit), que foram reincubados por 90 minutos, à temperatura ambiente (T.A.), ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução F ("Wash buffer", reagente presente no kit CBA), centrifugadas a 600 x g por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram, então, re-incubadas na presença 20 μ L do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas conjugados com ficoeritrina (PE) por 90

minutos a T.A., ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 μ L da solução F tampão de lavagem, centrifugadas a 600 x g por 7 minutos a 18° C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 μ L de reagente F e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

5.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS DE AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição dos dados obtidos foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD, EUA). Embora as esferas fluorescentes presentes no kit CBA sejam projetadas para serem excitadas com o laser de argônio (488nm), com emissão em comprimento de onda correspondente ao parâmetro Fluorescência 3 – FL-3, elas também podem ser excitadas pelo “red diodo laser”, com emissão de fluorescência detectadas no canal FL-4. Esta possibilidade de leitura pode ser obtida durante o processo de aquisição através da utilização do “Dual Laser CBA Template”, que simplifica os ajustes do equipamento, reduzindo a necessidade de compensações da interferência que a fluorescência emitida pelas esferas possa exercer sobre a fluorescência inerente aos anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2). Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foram obtidos com base em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Fig. 1A). Para a análise dos dados, inicialmente as microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura correspondentes a cada citocina, foram segregadas em gráficos de distribuição puntual FL-4 x FL-2, onde as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL-4). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL-2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada citocina presente na amostra (Fig. 1D). Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa de citocinas plasmáticas, uma curva padrão foi construída utilizando os dados dos padrões de citocinas em concentrações conhecidas (20pg/mL – 5000pg/mL) e empregada para determinar as concentrações de cada citocina no plasma teste. Um modelo de ajustamento através

da curva do 4º parâmetro logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras que não caíam dentro dos limites da curva padrão.

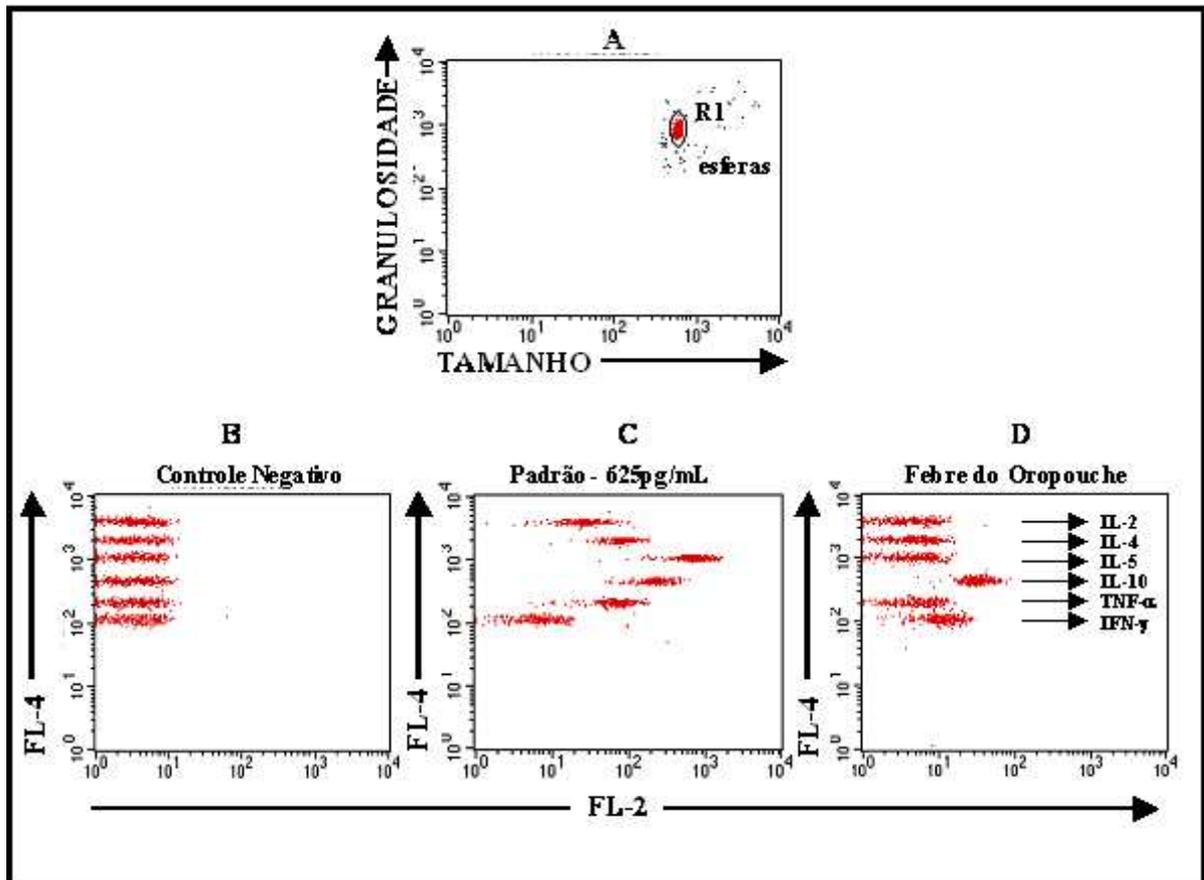


Figura 1: Figura adaptada de Pascoal (2005). Plataforma de esferas no sistema CBA.

Na figura 1 acima (A) demonstra a determinação da região da população de microesferas através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC); (B) discriminação das microesferas conjugadas com anticorpos monoclonais de captura de citocinas, projetadas com diferentes intensidades de fluorescência, posicionadas em regiões específicas ao longo do eixo Y (FL-4) em gráficos de distribuição puntual FL-2 versus FL-4; (C e D) deslocamento das microesferas, ao longo do eixo X (FL-2) em gráficos de distribuição puntual FL-2 versus FL-4, esquematicamente, proporcional à concentração de cada citocina presente nos padrões e no plasma teste, respectivamente.

5.7 ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DE BAIXOS E ALTOS PRODUTORES DE CITOCINAS

Para segregar os grupos em baixos e altos produtores de citocinas, para poder posteriormente fazer as comparações entre os grupos, foi realizada a análise da frequência de baixos e altos produtores de citocinas. Para cada um dos grupos estudados foi empregado uma estratégia de análise que consiste de 5 etapas:

1ª- Cálculo da mediana global: para cada citocina foi considerado todo o conjunto de valores obtidos para os grupos inseridos no estudo.

2ª- Categorização de baixos e altos produtores de citocinas: para cada grupo a mediana global das citocinas foi utilizada como o ponto de corte para identificar indivíduos baixos (\leq mediana global) e altos ($>$ mediana global) produtores de citocinas;

3ª- Compilação dos dados em diagramas: os dados referentes às categorias supracitadas foram compilados em diagramas, empregando cores específicas para designar baixos (○), e altos (●) produtores de citocinas pró-inflamatórias; baixos (○) e altos (●) produtores para as citocinas moduladoras e baixos (○) e altos (○) produtores de citocinas reguladoras cada grupo avaliado;

4ª- Cálculo do balanço de citocinas para cada grupo estudado: os dados obtidos nos diagramas da etapa anterior foram empregados para definir o balanço de citocinas para cada grupo em estudo, definindo três categorias de acordo com o predomínio de baixos produtores e altos produtores de citocinas pró-inflamatórias, altos e baixos produtores de citocinas moduladoras e altos e baixos produtores de citocinas reguladoras e que representa situações de equivalência entre altos produtores de citocinas pró-inflamatórias, moduladoras e reguladoras;

5ª- Estabelecimento do panorama de citocinas dos grupos: foi calculado para a população total dos grupos, o perfil global de citocinas representado pelo balanço de citocinas predominantes, compilando os perfis individuais inflamatórios, moduladores e reguladores.

Análise da Frequência de Altos Produtores de Citocinas

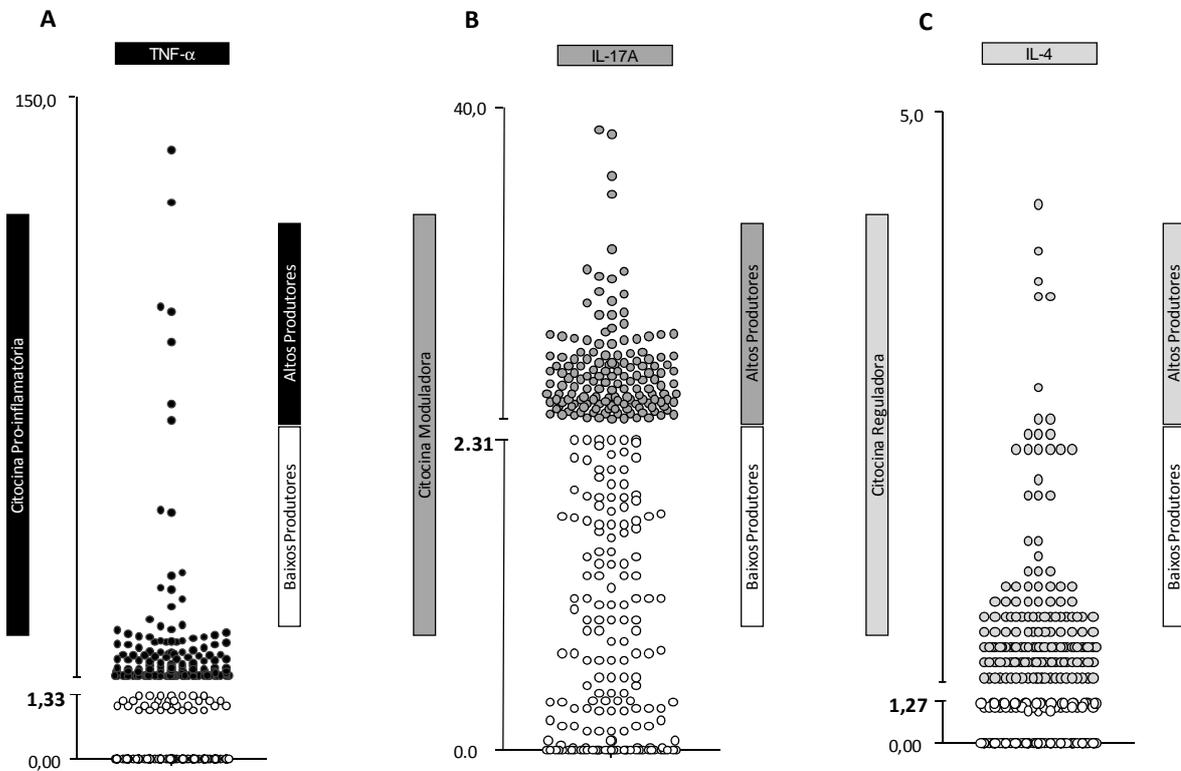


Figura 2: Cálculo do ponto de corte para segregar baixos e altos produtores de citocinas, empregando a mediana global dos valores de citocinas calculados por pg/mL. A) Cálculo do ponto de corte da citocina pró-inflamatória TNF- α , para segregar baixos (\circ) e altos produtores (\bullet) de TNF- α ; B) Cálculo do ponto de corte da citocina moduladora IL-17A, para segregar baixos (\circ) e altos produtores (\bullet) de IL-17A; C) Cálculo do ponto de corte da citocina reguladora IL-4, para segregar baixos (\circ) e altos produtores (\bullet) de IL-4.

Posteriormente todos os dados obtidos (clínicos, sorológicos e citocínicos), foram transformados em gráficos para uma correta análise, apresentação e discussão dos mesmos.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O perfil de citocinas dos diferentes subgrupos de pacientes, incluídos no 2º Grupo, foi comparado à assinatura de citocinas do 1º Grupo – Grupo Controle (Voluntários do HEMOPA).

Separadamente, as frequências dos altos produtores de cada citocina para cada subgrupo, foram comparadas às frequências dos altos produtores do Grupo Controle. Neste tipo de estratégia de análise, considera-se que houve diferença da expressão de citocinas quando se observa mudança de percentil (quadrante). Neste sentido, mesmo que a frequência de altos produtores de uma determinada citocina seja maior (visualmente) do que a frequência dessa mesma citocina no Grupo Controle, e, no entanto ambas estiverem no mesmo percentil (quadrante), não foi considerado diferença entre grupo investigado e o Grupo Controle. Ou seja, para ser considerada uma alteração na expressão de uma determinada citocina, esta deve ter mudado de percentil (quadrante) nos subgrupos em relação ao Grupo Controle.

6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo proposto neste projeto de tese foi autorizado pela Direção do Instituto Evandro Chagas (IEC), sob registro do Parecer de Aprovação número 0027/2010 (documento datado de 22 de setembro de 2010, que se encontra em anexo), e que foi submetido e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IEC, protocolado sob o número 0007/10.

7 FINANCIAMENTO DO ESTUDO

Para o desenvolvimento do presente estudo contou-se com financiamento do Instituto Evandro Chagas através da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, do CNPq (processo 301641/2010-2), do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará/NMT, por meio da concessão de bolsa de estudo. Também contamos com o apoio estrutural e profissional especializado da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA) e do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz/SVS/MS, Belo Horizonte - Minas Gerais.

8 RESULTADOS

Neste intróito vale ressaltar que os dados apresentados são correspondentes a três grupos de citocinas específicos: a) Pró-inflamatórias (IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12); b) Moduladoras (IL-23 e IL-17A) e c) as Reguladoras (IL-4, IL-5 e IL-10).

Nesse grupo controle então é observado que as citocinas reguladoras Th2 (IL-4 e IL-5) encontram-se abaixo da linha do percentil, ou seja, no quadrante inferior da figura, enquanto que a IL-10 encontra-se bem acima da linha reguladora quase a margem do quadrante superior.

Por outro lado, o gráfico do Grupo Controle demonstra ainda que as citocinas associadas a modulação via Th17 encontram-se abaixo da linha reguladora.

As demais citocinas, ou seja, as pró-inflamatórias (Th1) encontraram-se em sua maioria no segundo quadrante.

Determinação da assinatura de citocinas do grupo controle, como curva de referência para análise comparativa entre grupos.

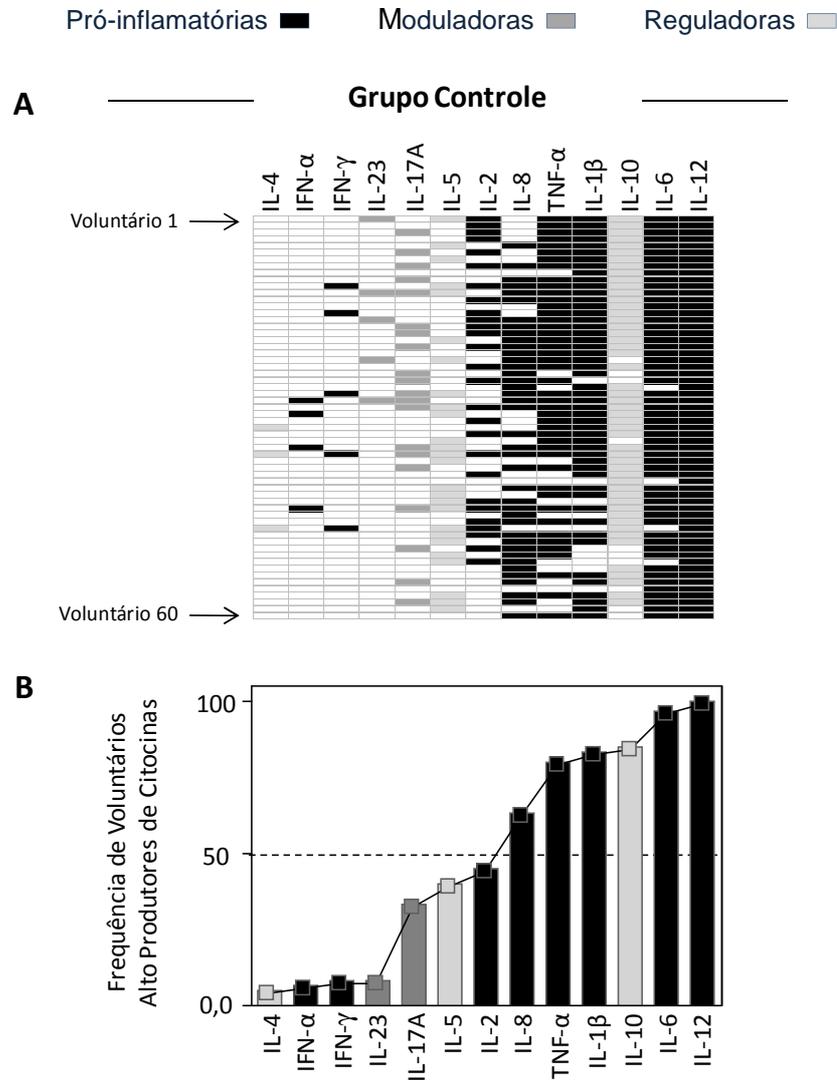


Figura 3: Montagem do perfil panorâmico de citocinas de cada indivíduo e a curva ascendente da assinatura de citocinas, revelando as frequências de altos produtores de citocinas do Grupo Controle. A) Montagem do perfil panorâmico de citocinas de cada indivíduo do Grupo Controle (n=60 voluntários do HEMOPA) no qual, destacam-se os baixos produtores de citocinas (□), os altos produtores de citocinas pró-inflamatórias (■), os altos produtores de citocinas moduladoras (■) e os altos produtores de citocinas reguladoras (□); B) Curva ascendente das assinaturas de citocinas (Th1, Th2 e Th17), revelando as frequências de altos produtores do Grupo Controle.

A figura 4 subdividida em 4A e 4B traz em seu contexto dois gráficos que demonstram o resultado da quantidade de citocina no grupo nomeado como não

respondedores e respondedores precoces respectivamente, realizada na primeira coleta.

Nesta etapa pode-se observar que as assinaturas citocinas séricas diferem entre indivíduos não respondedores e respondedores precoces, observando então que o grupo de indivíduos não respondedores apresenta um aumento na capacidade produtora de interferons (IFN- α e IFN- γ), bem como das citocinas moduladoras IL-23 e IL-17A e reguladora IL-4. No entanto, apresentam um déficit na produção de muitas citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela eliminação do vírus, como IL-8, IL-1 β e IL-12 (Fig. 4B).

Apresenta-se ainda que para a figura do grupo dos não respondentes em relação ao grupo controle as, IL-4, IFN- α , IFN- γ , IL-23 e IL-17A, saltaram acentuadamente do primeiro quadrante para o segundo quadrante.

Já as citocinas IL-5 e IL-2, apesar de demonstrarem uma pequena elevação em comparação ao grupo dos não respondedores e respondedores precoces, mantiveram-se no primeiro quadrante.

A IL-8 no grupo controle é apresentada no segundo quadrante, porém, na comparação entre os grupos não respondentes e respondentes, pode-se considerar que ela apresentou uma redução em sua expressão no grupo dos não respondedores, apresentando-se no quadrante inferior.

A TNF- α é apresentada no grupo controle no segundo quadrante, no entanto mostra-se com variação entre os grupos analisados nessa figura, apresentando-se no segundo quadrante no grupo dos não respondedores e no primeiro quadrante no grupo dos respondedores precoces, mostrando alteração nesse último grupo.

A IL-1 β , apesar de também ser apresentada no segundo quadrante no grupo controle, passa a se apresentar no primeiro quadrante tanto no grupo dos não respondedores como no grupo dos respondedores precoces.

Já na IL-10 que é apresentada no grupo dos não respondedores no segundo quadrante (de acordo com o grupo controle), apresenta-se no primeiro quadrante bem abaixo da linha de medida no grupo dos respondedores precoces.

As assinaturas de citocinas séricas diferem entre indivíduos respondedores e não respondedores na 1ª coleta

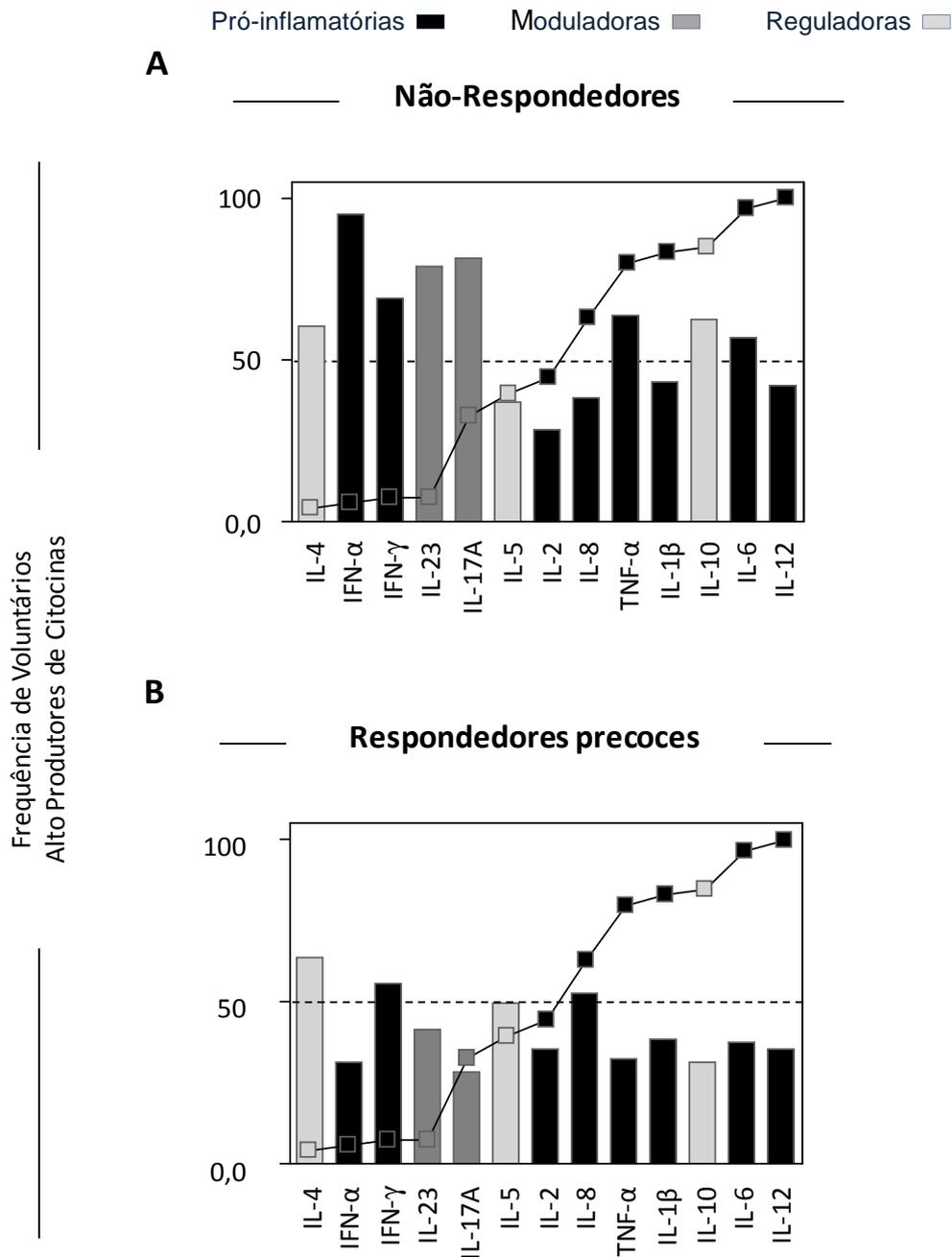


Figura 4: Análise comparativa da assinatura de citocinas do Grupo Controle e a frequência de altos produtores de citocinas dos grupos Não respondedores (A) e Respondedores precoces (B).

É observado ainda que os indivíduos respondedores precoces à infecção pelo *Vírus Oropoche* apresentam aumento na síntese de IL-4 e IFN- γ . Porém,

apresentam déficit na produção das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, bem como déficit de IL-10 (Fig. 4B).

Os dados apresentados na figura 5, também dividida em 5A e 5B, demonstram que nos respondedores precoces a taxa de IL-4 aparece acima da linha de medida, demonstrando alteração (enquanto os respondedores tardios mantiveram essa citocina abaixo da linha de medida). Já o IFN- α apresenta uma elevação considerável entre os grupos dos respondedores precoces e respondedores tardios, encontrando-se bem alterada (no segundo quadrante) nos respondedores tardios, enquanto se manteve de acordo com o grupo controle nos respondedores precoces.

Esta figura demonstra também um aumento de IFN- γ , IL-23, IL-17A e IL-5 em indivíduos respondedores tardios (Fig. 5B). Em contrapartida, foram identificados déficits na síntese de IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, bem como de IL-10.

Ainda nesta figura se pode observar que a soroconversão precoce induz um perfil de citocinas séricas diferente do perfil observado na soroconversão tardia, apesar de ambos terem lacunas na produção de citocinas pró-inflamatórias, evidencia-se a divergência das assinaturas séricas entre indivíduos respondedores precoces e respondedores tardios.

As assinaturas de citocinas séricas diferem entre indivíduos respondedores precoces e tardios

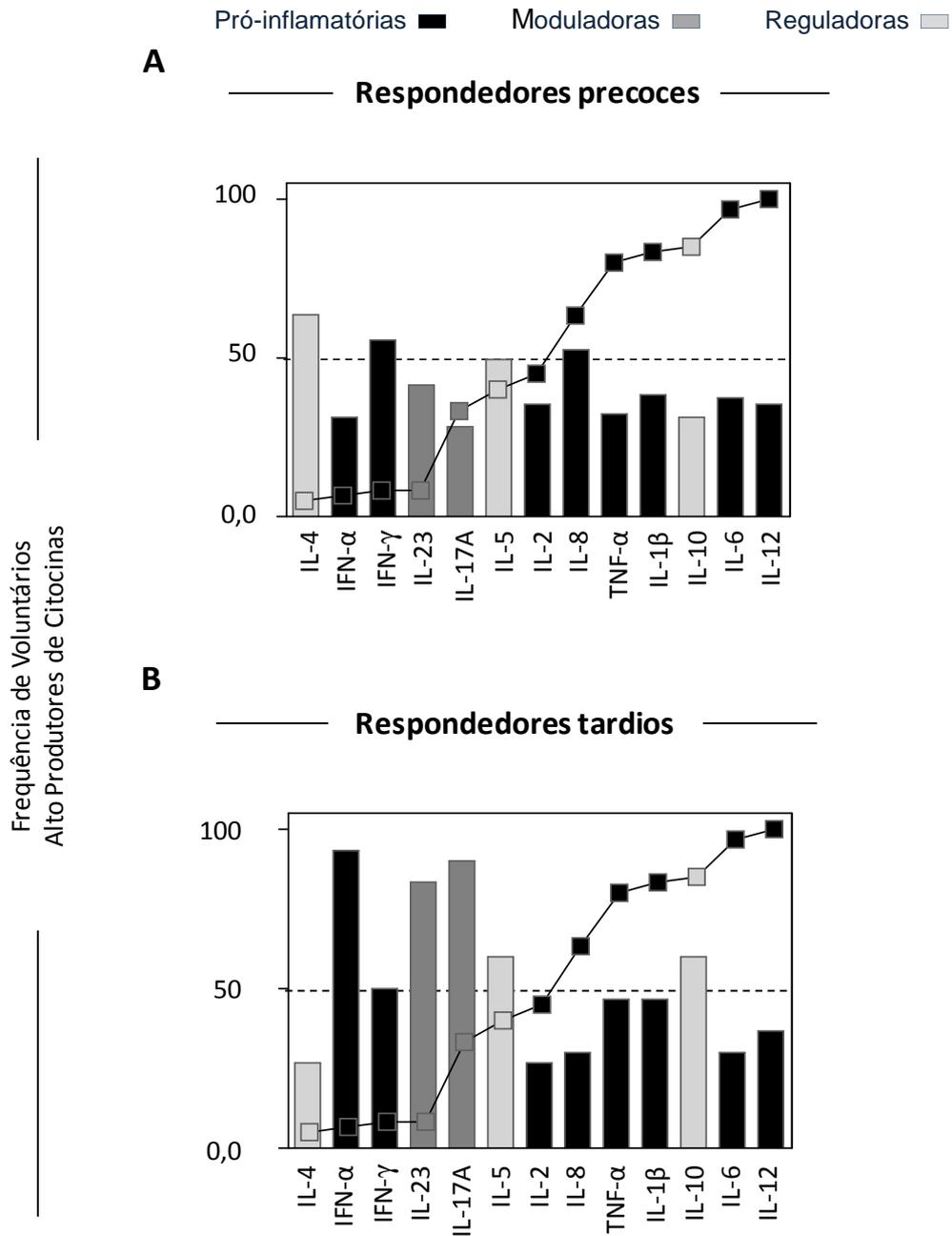


Figura 5: Análise comparativa da assinatura de citocinas do Grupo Controle e a frequência de altos produtores de citocinas dos grupos Respondedores precoces (A) e Respondedores tardios (B).

A figura 6 a seguir, também subdividida em 6A e 6B, demonstra que o fenômeno da soroconversão está diretamente associado a alterações nas assinaturas de citocinas séricas.

Desta feita, foi demonstrado, conforme se pode averiguar que o fenômeno da soroconversão no grupo de indivíduos respondedores tardios (2ª coleta), difere do perfil apresentado por eles mesmos quando eram não respondedores (1ª coleta).

Assim os dados extraídos do estudo demonstraram que o grupo de indivíduos não respondedores na 1ª coleta (Fig. 6A) e, mesmo o grupo de indivíduos, respondedores tardios (Fig. 6B), apresentam um aumento na capacidade produtora do IFN- α e das citocinas moduladoras via Th17 (IL-23 e IL-17A). Ambos os grupos apresentam um déficit na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-8, IL-1 β e IL-12, bem como déficit na síntese de IL-10. Ademais, os respondedores tardios apresentam déficit de TNF- α , IL-4 e IL-6, o que não ocorre com os não respondedores.

O fenômeno da soroconversão está associado a alterações nas assinaturas de citocinas séricas

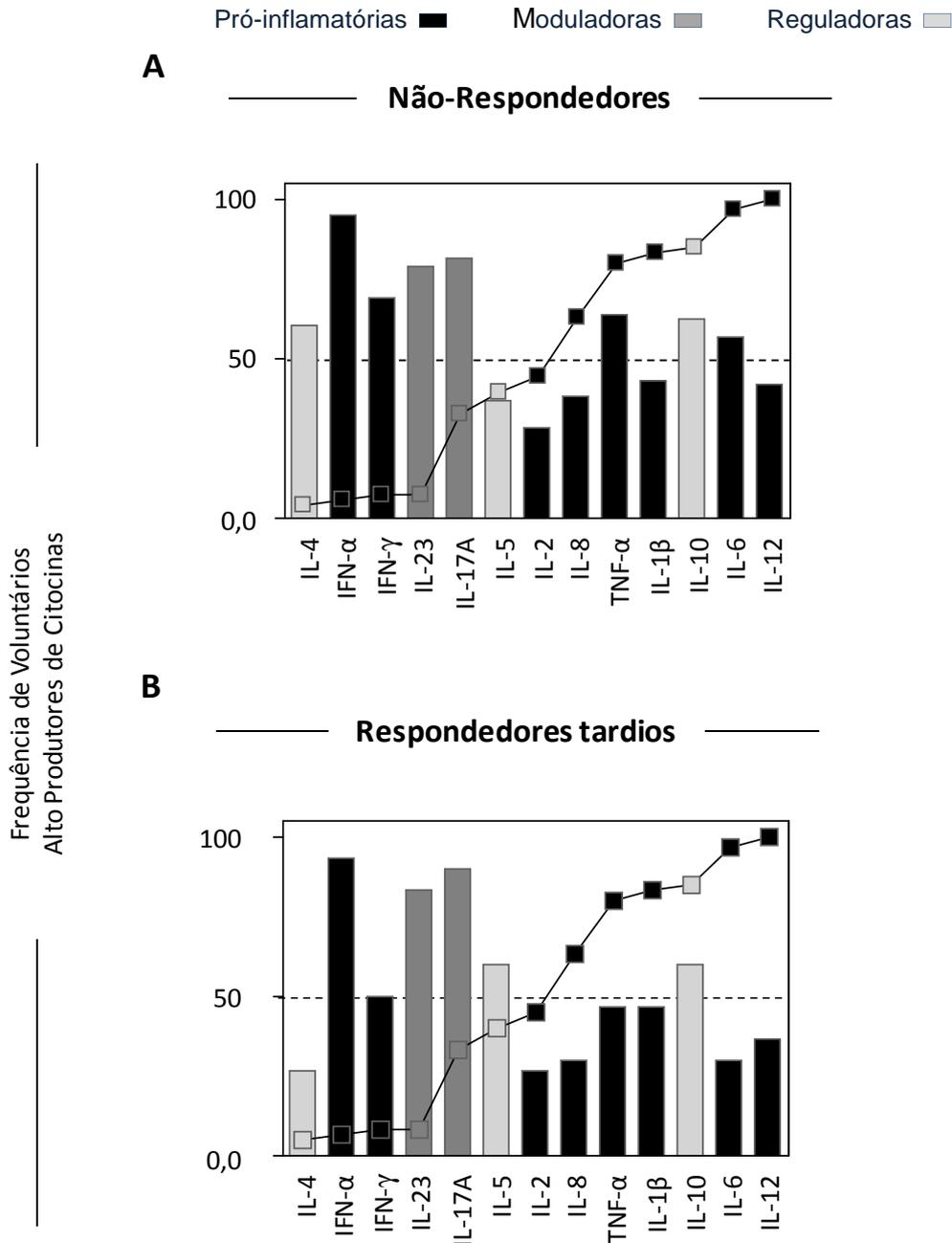


Figura 6: A soroconversão está associada a alterações nas assinaturas de citocinas.

Detalhando a apresentação deste resultado é observado que as citocinas IL-4 e IL-5 também sofreram variações entre o grupo de não respondedores e respondedores tardios, ambas passando do primeiro quadrante para o segundo quadrante em relação ao grupo controle. No entanto IL-4 sofreu alteração no grupo

dos não respondedores (Fig. 6A), enquanto a IL-5 no grupo dos respondedores tardios (Fig. 6B). Também sofreram variações IFN- γ , TNF- α , IL-6, as quais passaram do segundo quadrante do grupo não respondedores para o primeiro quadrante no grupo dos respondentes tardios.

A IFN- α também apresentou alterações, estando nos dois grupos no segundo quadrante, juntamente com IL-23 e IL-17A.

Por outro lado, em ambos os grupos, alteraram-se para o primeiro quadrante, apresentando déficits, as citocinas IL-8, IL-1 β , IL-12.

A figura 7 mostra que o grupo de indivíduos não respondedores que apresentavam sintomas na 1^a coleta, é caracterizado pelo aumento de várias citocinas, pró-inflamatórias (IFN- γ e IFN- α), reguladora (IL-4) e moduladoras (IL-23 e IL-17A). Estes aumentos foram acompanhados de déficits na síntese de IL-8, IL-1 β e IL-12 (Fig. 7A).

As diferenças entre as assinaturas séricas de indivíduos não respondedores sintomáticos e não respondentes assintomáticos demonstram a não variação da IL-4 nos dois grupos, se mantendo sempre no segundo quadrante, assim como IFN- α , IFN- γ , IL-23, IL-17A e TNF- α . No entanto, cabe ressaltar que todas essas citocinas apresentam-se alteradas, com maior expressão em ambos os grupos, quando comparados com o Grupo Controle.

Houve déficit da expressão da IL-10 e IL-6 nos não respondedores assintomáticos. Também foi identificada uma pequena variação da IL-5 em ambos os grupos, no entanto considera-se que essa citocina ainda se manteve de acordo com o grupo controle. Manteve-se também no primeiro quadrante, ou seja, sem variações em ambos os grupos, a IL-2.

Diferenças entre as assinaturas citocinas séricas de indivíduos não respondedores sintomáticos e assintomáticos na 1ª coleta

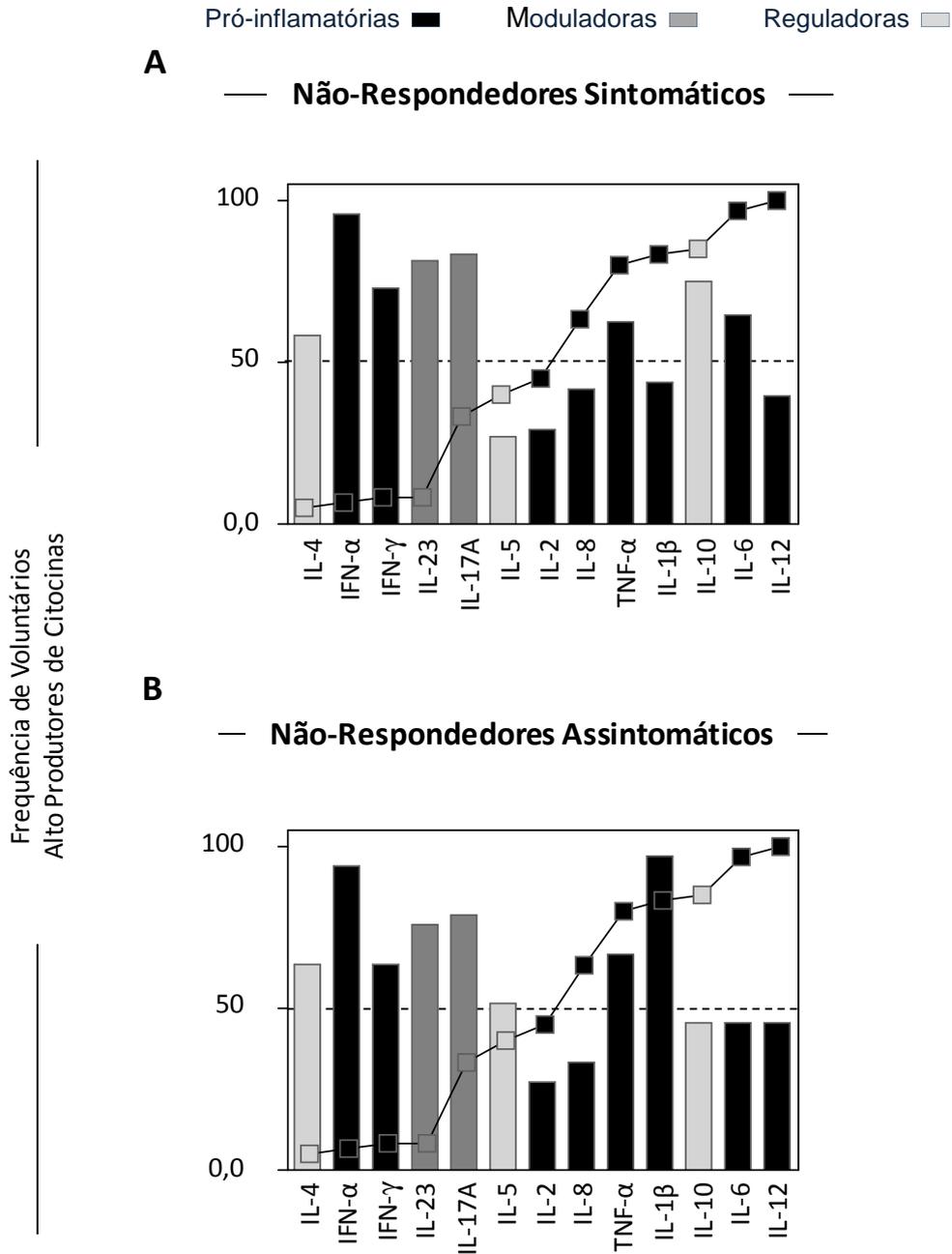


Figura 7: Assinaturas citocinas séricas de indivíduos Não respondedores sintomáticos (A) e assintomáticos (B) na 1ª coleta.

A figura 8 corresponde ao impacto do amadurecimento na assinatura de citocinas séricas nos grupos de respondedores precoces e no grupo chamado respondedores precoces prolongados, também dividida em figura 8A e 8B,

evidenciando nesta análise que o grupo de indivíduos que soroconverteram na 1ª coleta (Fig. 8A) e mantiveram títulos de anticorpos na 2ª coleta (Fig. 8B), apresentaram a manutenção da elevada expressão da IL-4, bem como apresentaram o aumento de IL-5. Logo, a persistência da soroconversão induz a uma tendência reguladora da infecção.

Quanto às alterações constatadas nesta etapa, observamos apenas uma alteração, sendo ela apenas a alteração da IL-5 (como já citado anteriormente), passando do primeiro para o segundo quadrante no grupo dos respondedores precoces prolongados. Já as demais citocinas mantiveram-se com o mesmo perfil de expressão para ambos os grupos.

Impacto do amadurecimento na assinatura de citocinas séricas

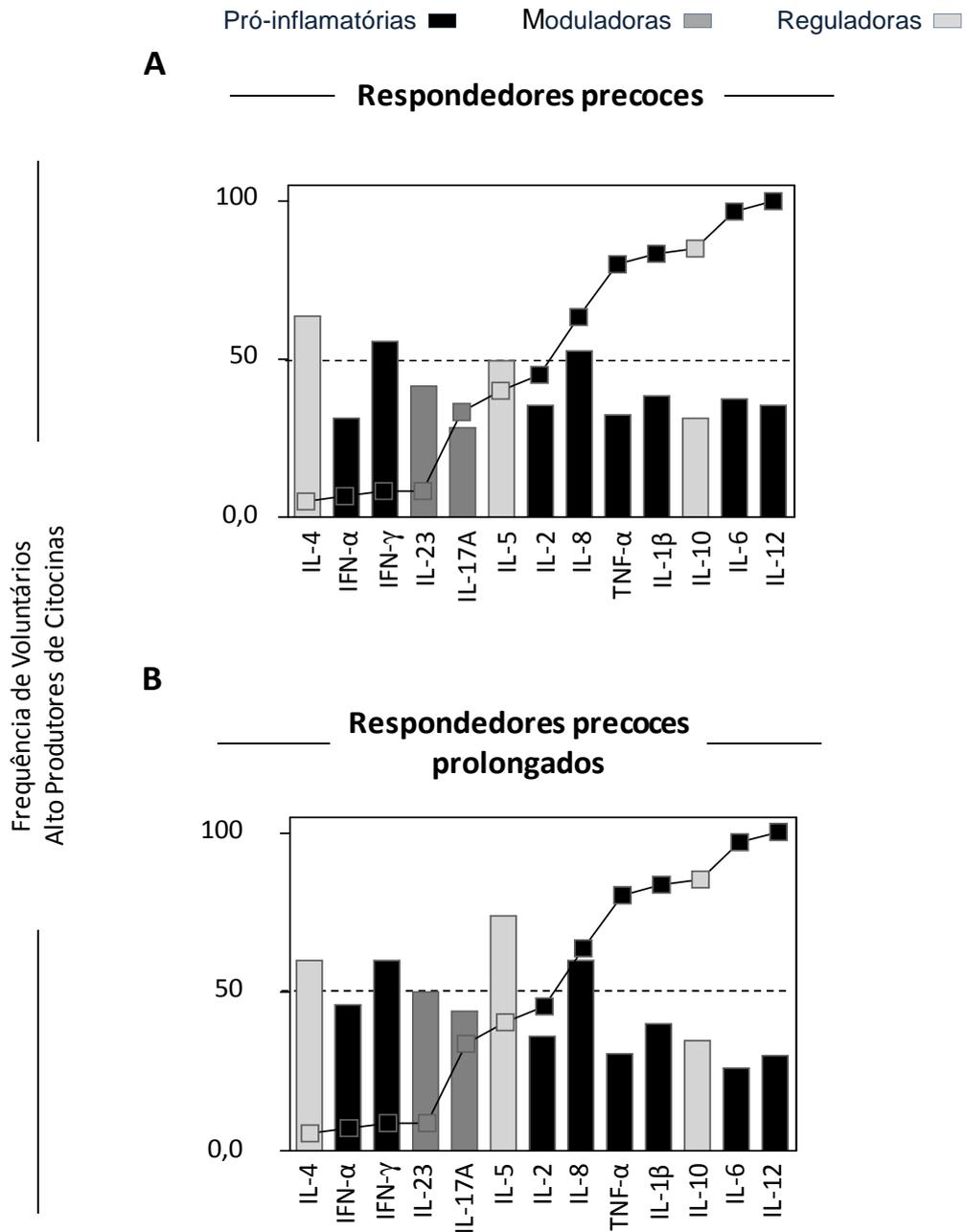


Figura 8: Impacto do amadurecimento na assinatura de citocinas séricas de Respondedores precoces (A) e Respondedores precoces prolongados (B).

A figura 9 demonstra a associação entre o perfil de citocinas séricas em indivíduos respondedores precoces e os títulos de anticorpos, diferenciando indivíduos respondedores que são baixos produtores de anticorpos e altos produtores de anticorpos (Fig. 9A).

Associação entre o perfil de citocinas séricas indivíduos respondedores precoces e os títulos de anticorpos

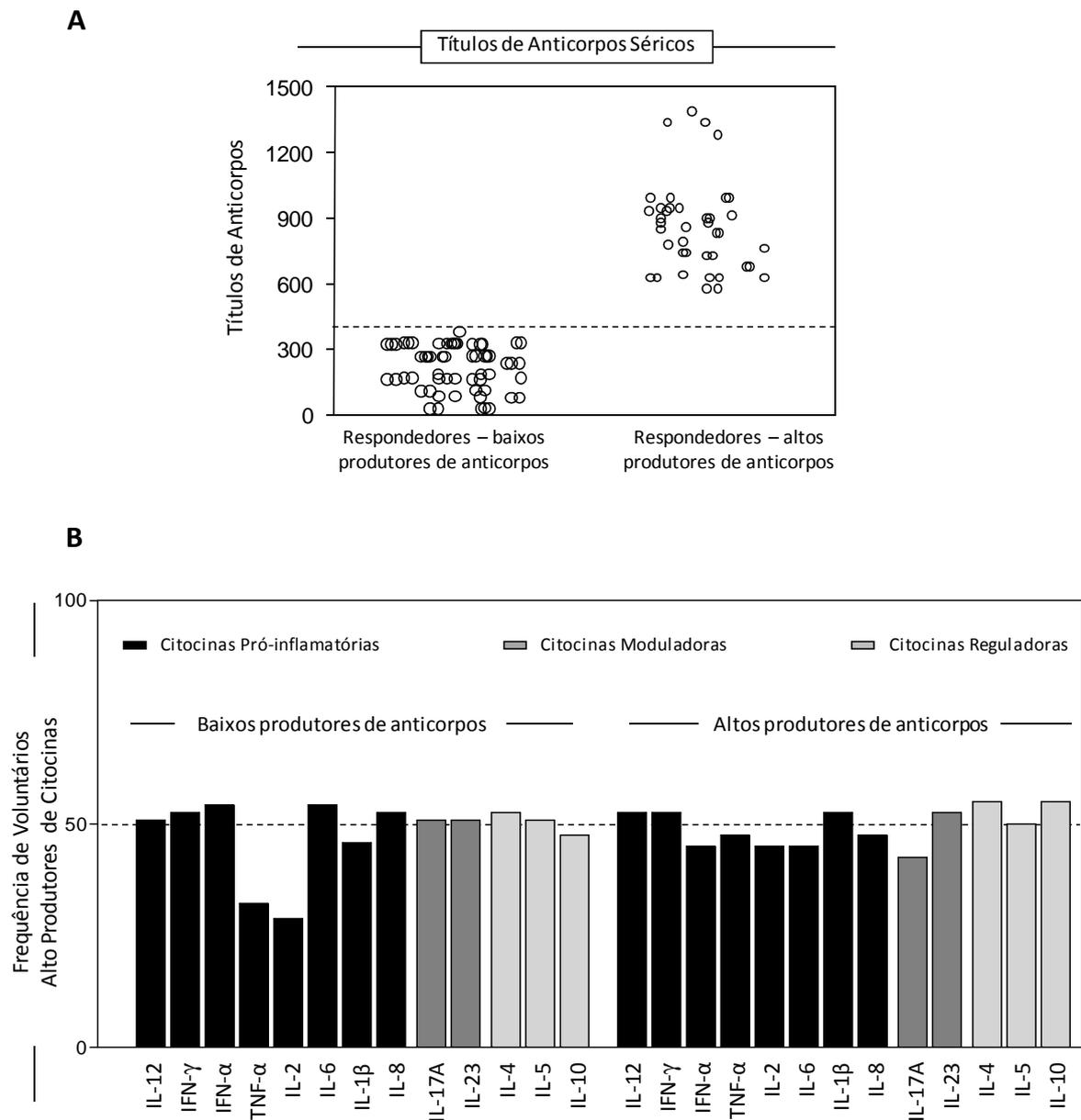


Figura 9: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e os títulos de anticorpos.

Na figura 9B, podem ser evidenciadas alterações nas citocinas pró-inflamatórias (Th1), moduladoras (Th17) e reguladoras (Th2), sendo estas alterações expressadas da seguinte forma:

Houve alteração das citocinas pró-inflamatórias IFN- α , IL-6 e IL-8, que passaram do segundo quadrante no grupo dos baixos produtores para o primeiro quadrante no grupo dos altos produtores, já no grupo dos altos produtores, a IL-1 β passou do primeiro quadrante, nos baixos produtores, para o segundo quadrante nos altos produtores de anticorpos.

Nas citocinas moduladoras houve apenas uma pequena variação na IL-17A, passando da linha de medida do segundo quadrante nos baixos produtores de anticorpos para o primeiro quadrante no grupo dos altos produtores de anticorpos, já a citocina moduladora IL-23 manteve-se no segundo quadrante nos dois grupos.

Com relação às citocinas reguladoras pode ser observada a estabilidade da IL-4 nos dois grupos, uma pequena variação da IL-5 do segundo quadrante, no grupo dos baixos produtores de anticorpos, para o primeiro quadrante nos altos produtores de anticorpos. De forma contrária ocorre com a IL-10 que passou do primeiro quadrante, no grupo dos baixos produtores, para o segundo quadrante no grupo dos altos produtores.

A figura 10 a seguir, apresenta a associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos respondedores precoces com ou sem a presença de febre. É demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias em indivíduos sem febre se apresentam num certo padrão, encontrando-se em sua maioria no quadrante inferior (IFN- α , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-8), e somente a IL-12 e IFN- γ , encontram-se no segundo quadrante.

No entanto, quando o grupo apresenta quadro febril, essas citocinas passam a ter um comportamento quase que totalmente contrário, apresentando-se em sua maioria (IFN- α , IL-6, IL-1 β , IL-8) no quadrante superior, sendo observada maior elevação na IFN- α que passa do seu nível do extremo do primeiro quadrante (sem febre) para o extremo do segundo quadrante (com febre). Ainda nas citocinas pró-inflamatórias é observado que a IL-12 tem uma queda do segundo para o primeiro quadrante, quando o indivíduo apresentava quadro febril e as TNF- α , IL-2, apesar de haver elevação, continuam no primeiro quadrante, o que nos sugere ser não considerável tal elevação.

As citocinas moduladoras (IL-17A e IL-23) apresentam consideráveis expressões, onde nos indivíduos sem febre apresentam-se na margem do primeiro quadrante saltando consideravelmente para margem do segundo quadrante nos indivíduos com febre, assim como observado na pró-inflamatória IFN- α .

Observando o comportamento das citocinas reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10, nota-se que duas mantiveram-se no mesmo quadrante em ambos os casos (IL-4 no quadrante superior e IL-10 no quadrante inferior) e apenas a IL-5 passou do primeiro quadrante (sem febre) para o segundo quadrante (com febre).

Associação entre o perfil de citocinas séricas indivíduos respondedores precoces e a presença de febre

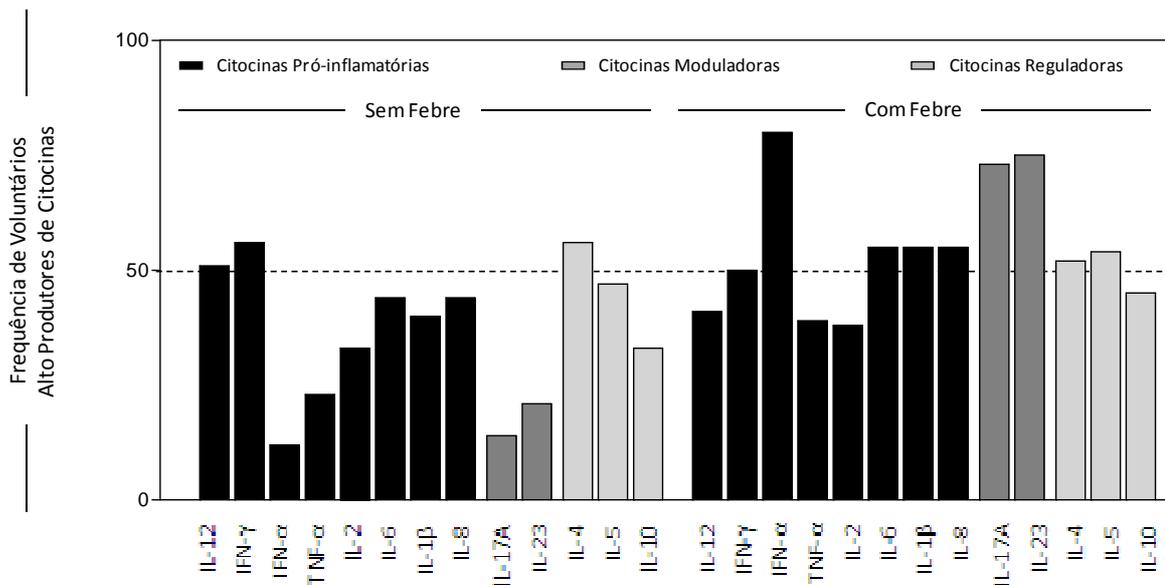


Figura 10: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de febre.

A figura 11 mostra os resultados da associação entre o perfil de citocinas séricas em indivíduos respondedores precoces com e sem a presença de calafrios.

O primeiro fato a chamar a atenção é que a citocina pró-inflamatória IFN- α assim como em indivíduos com febre e sem febre, também apresenta o mesmo comportamento, passando do primeiro quadrante sem a presença de calafrios para o

extremo do segundo quadrante com a presença de calafrios, outras elevações também são observadas neste contexto.

Além da IFN- α , as citocinas IFN- γ , IL-6, IL-1 β e IL-8, passam do primeiro quadrante sem a presença de calafrios, para o segundo quadrante quando são sujeitas a presença de calafrios, mantendo-se do mesmo primeiro quadrante apenas a TNF- α , IL-12 e IL-2.

As citocinas moduladoras IL-17A e IL-23 com a presença de calafrios também passam para o segundo quadrante. Já as citocinas reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10 apresentam variações sem a presença de calafrios e com a presença de calafrios, tais variações ficam mais evidentes da alteração da IL-5 do primeiro quadrante (sem calafrios), para o segundo quadrante (com calafrios), e a queda da IL-4 do segundo quadrante (sem calafrios), para o primeiro quadrante (com calafrios), já a IL-10 manteve-se no primeiro quadrante nos dois grupos.

Associação entre o perfil de citocinas séricas indivíduos respondedores precoces e a presença de Calafrios

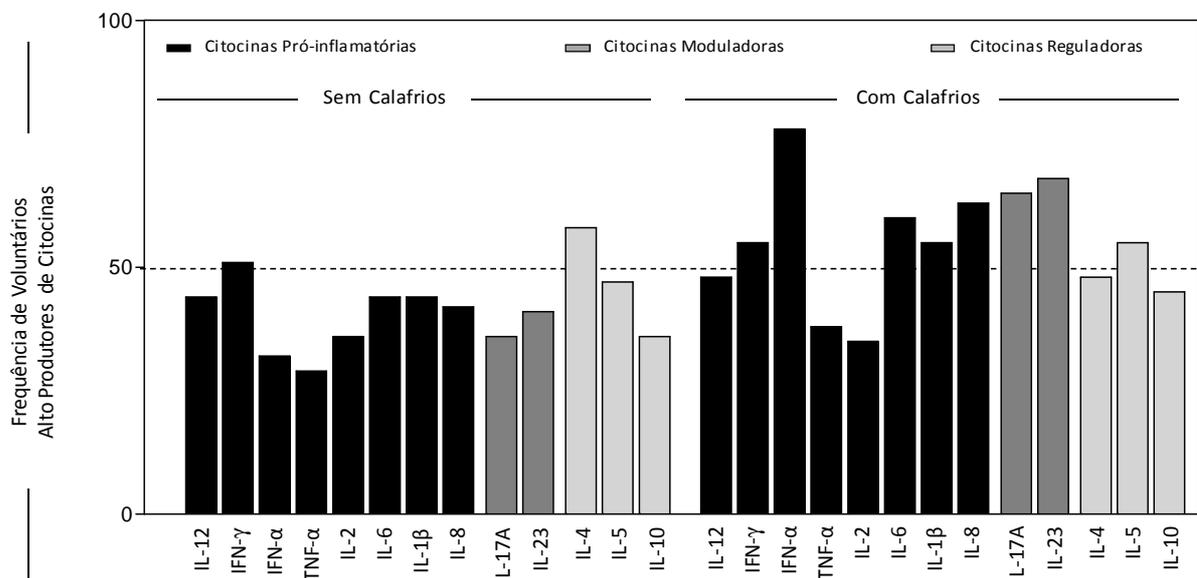


Figura 11: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de calafrios.

A figura 12 apresenta a associação entre o perfil de citocinas séricas em respondedores precoces que apresentam a presença ou não de cefaléia. Ainda é observado que assim como na presença de febre, e a presença de calafrios, a IFN- α apresentou-se variável do extremo inferior do primeiro quadrante no caso dos indivíduos respondedores precoces sem cefaléia, para o extremo superior do segundo quadrante nos indivíduos respondedores precoces que apresentaram cefaléia em seu quadro clínico.

Além da IFN- α , as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e IL-8, apresentaram alteração do primeiro quadrante em indivíduos sem cefaléia para o segundo quadrante em indivíduos que apresentam cefaléia. Ao contrário a citocina pró-inflamatória IL-12 apresenta-se no segundo quadrante em indivíduos sem cefaléia e caiu para o primeiro quadrante em indivíduos com cefaléia.

A IFN- γ manteve-se no segundo quadrante, tanto em indivíduos respondentes precoces sem cefaléia e com cefaléia. Já a TNF- α e IL-2, mantiveram-se no primeiro quadrante.

As citocinas moduladoras IL-17A e IL-23 apresentaram notável elevação entre os indivíduos sem cefaléia apresentando-se no primeiro quadrante, e os indivíduos com cefaléia, segundo quadrante. Já as citocinas reguladoras IL-4 e IL-10 mantiveram-se no mesmo quadrante tanto nos indivíduos sem cefaléia, quanto em indivíduos com cefaléia. Alterando-se apenas a IL-5 para o segundo quadrante quando os indivíduos apresentaram cefaléia.

Associação entre o perfil de citocinas séricas indivíduos respondedores precoces e a presença de cefaléia

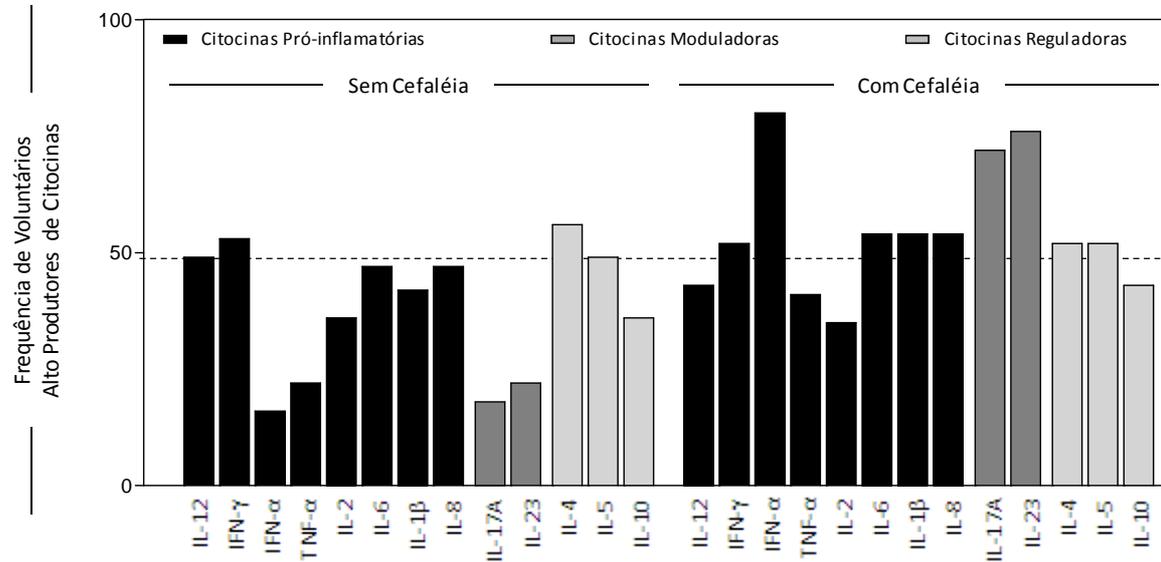


Figura 12: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de cefaléia.

A figura 13 apresenta a associação entre o perfil de citocinas séricas em indivíduos respondedores precoces e a presença de tontura, onde mais uma vez é destacada a elevação da citocina pró inflamatória IFN- α , a qual se apresenta no primeiro quadrante entre os indivíduos sem tontura e eleva-se para o extremo do segundo quadrante nos indivíduos com tontura. Ao contrário dos demais resultados as citocinas pró-inflamatórias apresentam uma considerável estabilidade mantendo-se no primeiro quadrante: IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1 β , passando para o segundo quadrante apenas a IL-8 e a IFN- α como já citado anteriormente.

Nas citocinas moduladoras, o resultado também foi comparado aos demais, cujas ambas apresentaram consideráveis variações do primeiro quadrante nos indivíduos sem tontura para o segundo quadrante em indivíduos com tontura. As citocinas reguladoras apresentaram apenas a modificação do primeiro para o segundo quadrante da IL-5, as demais IL-4 e IL-10, mativeram-se no mesmo quadrante nos dois grupos.

Associação entre o perfil de citocinas séricas indivíduos respondedores precoces e a presença de tontura

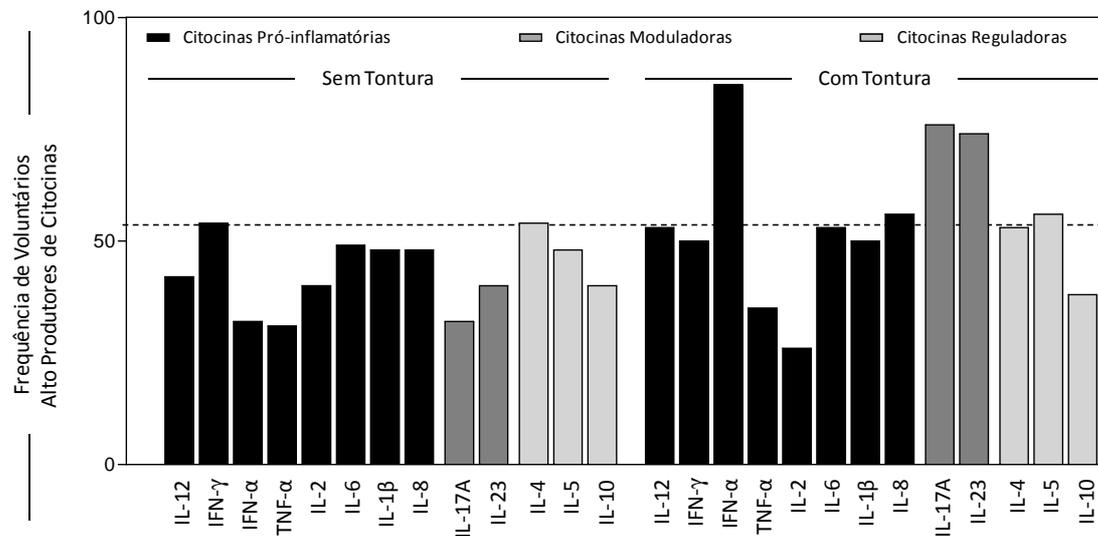


Figura 13: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de tontura.

A figura 14 apresenta a associação entre o perfil de citocinas séricas em indivíduos respondedores precoces e a presença de febre, calafrios, cefaléia e tontura simultaneamente.

Cabe ressaltar que para a correta análise dos grupos presentes nessa figura avaliou-se os grupos de indivíduos com ou sem cada sintoma específico separadamente (Fig. 10, 11, 12 e 13), em seguida foi realizada uma análise conjunta de todos os indivíduos que apresentavam os quatro sintomas, sempre comparando com àqueles do grupo dos respondedores precoces.

Para os quatro sintomas investigados (febre, calafrios, cefaléia e tontura) em relação ao perfil de citocinas séricas, os indivíduos que apresentaram separadamente os quatro sintomas, também apresentaram quando analisados em conjunto, alta produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- α , IL-6, IL-1 β e IL-8 e citocinas moduladoras IL-17A e IL-23, com exceção dos indivíduos que queixaram de tontura, que apresentaram o mesmo perfil exacerbado, exceto para as citocinas IL-6 e IL-1 β .

Assim, como nos demais casos para a citocina pró-inflamatória IFN- α e as citocinas moduladoras IL-17A e IL-23, há uma elevação extrema do primeiro quadrante para o segundo quadrante.

Mantiveram-se no mesmo quadrante dos indivíduos sem os quatro sintomas e com os quatro sintomas, as citocinas pró-inflamatórias IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e as citocinas reguladoras IL-4 e IL-10.

Além das citocinas IFN- α , IL-17A e IL-23 também passaram do primeiro para o segundo quadrante as citocinas IL-6, IL-1 β , IL-8 e IL-5. Cabe resaltar que a IL-5 sofreu alterações em sua expressão em todos os sintomas investigados (febre, calafrios, cefaléia e tontura), tanto quando estes foram avaliados separadamente quando em conjunto, passando esta do primeiro para o segundo quadrante no momento em que os indivíduos apresentavam esses sintomas.

Associação entre o perfil de citocinas séricas indivíduos respondedores precoces e a presença de febre, frio, cefaléia e tontura simultaneamente

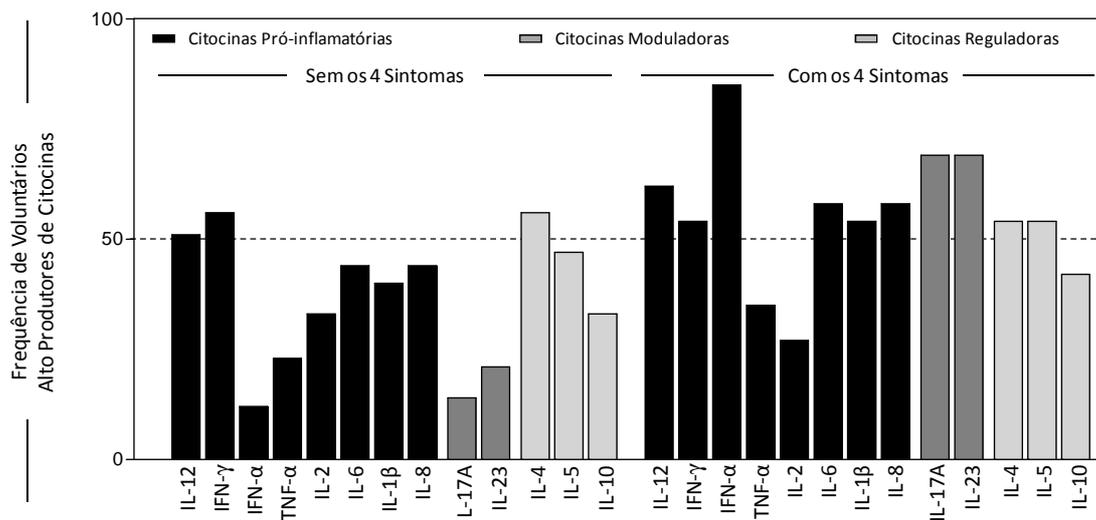


Figura 14: Associação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos Respondedores precoces e a presença de febre, calafrios, cefaléia e tontura simultaneamente.

9 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado mundialmente que evidencia a caracterização da resposta imune citocínica em infecções humanas pelo *Vírus Oropouche*, sendo assim, foram evidenciados dados relevantes não apenas para o estudo aqui apresentado, mas também, como base para estudos posteriores como será melhor exposto da conclusão desta tese.

Ainda por esse motivo, a discussão realizada não terá comparações diretas com outros estudos que relacionem especificamente a resposta imune citocínica pelo vírus aqui estudado, mas sim, fará um comparativo dos resultados, sempre que possível, com estudos realizados com outros arbovírus e demais agentes infecciosos, que se apresentem com aspectos relevantes para a conclusão deste.

Para melhor e mais completo esclarecimento é importante que se observe a diferença entre as citocinas pró-inflamatórias (Th1) e as citocinas reguladoras (Th2), dando ênfase ao fato de que também é relevante conhecer o papel das citocinas de modulação via Th17, para que então ocorra a interpretação correta dos dados obtidos nesse estudo. Como anteriormente, essa caracterização destacada através das revisões bibliográficas, torna-se importante um resumo sobre o fato, para que se possa então observar os principais pontos nesse contexto de análise.

Ressalta-se ainda que a resposta Th2 produz citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, que são importantes na formação de anticorpos, já a resposta linfocitária do tipo Th1 induz citotoxicidade e resposta inflamatória decorrente da produção de IL-2, IL-8, IFN- γ , IFN- α e TNF- α .

Assim, comparando o perfil da assinatura de citocinas do grupo controle aos perfis observados nas primeiras análises, que apresentam a variação de várias citocinas pró-inflamatórias de acordo com a presença do vírus, os nossos resultados estão de acordo com o estudo de Martins et al (2007), que demonstraram as características fenotípicas da imunidade inata, relatando que a IL-8 se correlaciona com a desgranulação de neutrófilos, interagindo CD23 com a cadeia alfa da família B2, liberando posteriormente mediadores pró-inflamatórios (citocinas), que nos nossos resultados podem ser destacados principalmente o IFN- α e IFN- γ .

Embora os estudos nessa área tenham avançado bastante, a regulação dos perfis Th1/Th2 ainda é pouco conhecida. O papel da IL-4, por exemplo, pode ser

contraditório: *in vitro*, a IL-4 acrescentada depois de estimulação celular diminui a produção de IFN- γ e, portanto do perfil Th1, agindo como Th2. Em compensação, acrescentada às células antes da estimulação, a IL-4 produz aumento do IFN- γ , tendo, portanto, uma ação a favor do perfil Th1 (DESREUMAUX, 2010).

A IL-10 também tem papel fundamental em atividades de regulação, ativando neutrófilos pelos lipolissacarídeos (LPS) promovendo assim, um forte aumento desta, a qual pode desempenhar um papel importante do balanceamento entre as atividades benéficas e prejudiciais nos locais de inflamação (MARTINS et al., 2007).

Como demonstrado em nossos resultados (Fig. 5), os indivíduos respondedores precoces à infecção por Oropoche, apresentaram aumento na síntese de IL-4 (Th2) e IFN- γ (Th1). Porém, apresentam déficit na produção das citocinas pró-inflamatórias, TNF- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-12, bem como déficit da reguladora IL-10 (Fig. 5A). Isso pode demonstrar em nosso estudo a interação das citocinas inflamatórias (Th1) e reguladoras (Th2), no processo de inflamação.

Libraty et al (2002) demonstraram que pacientes que montam uma resposta de células T auxiliares, com padrão Th1 no início da infecção e a sustentam ao longo do processo parecem ter uma menor tendência ao desenvolvimento de formas graves da doença, diferente dos que desenvolvem uma resposta de células T auxiliares com padrão Th2, ou que mudam de Th1 para Th2 ao longo da infecção, os quais apresentam maior risco de evoluírem para as formas graves (FHD/SCD).

A ausência de sintomas (Fig. 7B) é caracterizada também por todas as observações feitas na figura 5, em relação aos perfis Th1 e Th2. No entanto, os indivíduos não respondedores assintomáticos apresentam ainda um aumento da síntese de IL-5, seguida de uma elevada produção de IL-1 β , seguido de déficit de IL-6 e IL-10. O que pode representar novamente o balanço entre os dois perfis sendo medeado dessa vez por outras citocinas.

A IL-6 apresenta um papel importante no desenvolvimento de auto-anticorpos contra plaquetas e células endoteliais, contribuindo para a trombocitopenia e o extravasamento de plasma dos vasos sanguíneos observados nos casos graves de arbovírus como a Dengue (RACHMAN e RINALDI, 2006).

Para Zago (2010) a IL-6 é uma citocina que atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Ela é sintetizada por fagócitos mononucleares, células do

endotélio vascular, fibroblastos e outras células, em resposta a microorganismos invasores.

Os dados encontrados no presente estudo, até este momento, podem ser corroborados com trabalho realizado por Almeida et al (2011), onde estudando pacientes com o *Vírus da hepatite C* (HCV), demonstraram que os níveis séricos de citocinas detectados através de ensaio imunoenzimático, estavam relacionados com o nível de sonolência do indivíduo. O estudo demonstrou que o aumento na concentração sérica de IL-6 e IL-12, juntamente com níveis baixos de IL-8 e IL-10 é marca registrada da hepatite C, estando este perfil relacionado diretamente com indivíduos mais sonolentos e menos sonolentos.

Almeida et al (2011) conclui ainda, após análise mais detalhada de cada analito sérico nas curvas de assinatura de citocinas, que a menor frequência de IL-10 foi observada em pacientes HCV positivos que apresentaram excesso de sonolência, enquanto o aumento de IL-6 foi encontrado em pacientes HCV classificados com insônia.

Por outro lado, em relação a resposta da imunidade inata, Silva et al (2010) demonstraram em seu estudo que a revacinação contra o VFA, acompanhada por níveis protetores de anticorpos neutralizantes, modificam os níveis de citocinas e a resposta da imunidade inata para a síntese aumentada de IL-12 e TNF- α por neutrófilos comparados aos grupos não vacinados e primovacinação que soroconverteram. Nota-se ainda o fato do estudo com esse arbovírus exibir um suposto padrão pró-inflamatório na imunidade adaptativa, com aumento na produção de TNF- α por células B e de produção mais baixa de IL-4 por células T CD4 comparado aos não vacinados, juntamente com síntese basal de IL-10 por células T CD8.

Como já se conhece, geralmente as citocinas com perfil Th1, tais como a IL-2, TNF- α , IFN- α e IFN- γ , se opõe à resposta Th2 representada por citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-10. Bozza et al (2008) em estudos realizados com Dengue, demonstraram que o IFN- γ é um fator preditivo para a severidade da infecção; geralmente essa citocina inibe as representações dependentes de citocinas de perfil Th2, como a IL-10, por exemplo.

Novamente esses dados supra citados se correlacionam com os resultados encontrados na presente pesquisa, onde pode ser percebido em muitos dos grupos

estudados que quando havia aumento de IFN- α e IFN- γ (Th1) simultaneamente ocorria diminuição da expressão de IL-10 (Th2).

Algo que se pode perceber nessa primeira análise é o fato de não haver equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e as citocinas reguladoras.

Neste contexto, alerta-se também ao fato de que o papel da IL-10, considerada como uma citocina reguladora é bastante complexo, pois outros estudos como o de Desreumaux (2010), destacam que esta promove a diminuição de IL-1 β , IL-8 e de TNF- α , citocinas que, por sua vez, possuem ação positiva sobre a síntese de IL-10. Desreumaux (2010) considera também que essa auto-regulação negativa aumenta a produção do antagonista para o receptor de IL-2 e diminui os perfis Th1, mas também os perfis Th2 (em baixas doses), dando ênfase ao fato de que deve ser considerado o uso em doses elevadas (superiores a 20mg/kg), sendo que neste caso o efeito de IL-10 é pro-inflamatório.

Outros estudos com arbovírus podem ser citados ainda como, por exemplo, o estudo de Silva et al (2011) no qual foi identificado a presença e a frequência das citocinas IL-12, IFN- α , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 em indivíduos amarelos, sendo estas observadas incidindo sobre os neutrófilos circulantes, monócitos, células NK, células T CD41, CD81 células T e células B, sendo determinado a curto prazo *in vitro* (incubação de todas as amostras de sangue) que a vacinação foi capaz de aumentar a síntese de IL-12 por neutrófilos.

Barros et al (2009) ao estudar alguns flavivírus brasileiros em modelos experimentais de camundongo, observaram que a modulação pela produção de citocinas bem como as células estudadas podem ter uma importante atividade antiviral sintetizando reativos radicais livres como o óxido nítrico (NO), que pode ter um efeito microbicida como mediador da inflamação, contribuindo para a eliminação do vírus.

Já as citocinas com perfil Th17, são citocinas mais complexas, recentemente descobertas, a qual exprime IL-17A, IL-23, e TNF- α , mas não IFN- γ e IL-4, podendo, portanto, ser considerada uma nova população, como mostra Desreumaux (2010).

Geralmente se considera que as citocinas Th17 vão para a periferia e interagem com os neutrófilos ativando-os para que estes possam ter a sua ação pró-inflamatória e é neste contexto que as células ativadas vão tentar eliminar o antígeno do organismo seja ele vírus, bactéria, transplante ou alérgico.

O que realmente ocorre nesse grupo é que a citocina IL-17A (IL-17) é uma citocina pleiotrópica homodimérica que define o linfócito T auxiliar 17 na linhagem celular. Já a IL-17A e IL-17F são dois membros da família da citocina 17 secretadas pelos linfócitos T auxiliar 17 e dividem os mesmos receptores, IL-17RA e IL-17RC, os quais são expressos conjuntamente em diversas células como ceratinócitos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, células epiteliais, endoteliais e células dendríticas, o que mostra a natureza pleiotrópica da IL-17A (AMARAL, 2011).

Nesta situação, a ativação da célula pela IL-17A, pode causar a liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da destruição tecidual, uma vez que a IL-17A é produzida não só por células com perfil Th17, mas também por macrófago, células de Langerhans, mastócitos e astrócitos (AMARAL, 2011)

Neste aspecto, a IL-17A contribui para a patogênese de uma série de doenças auto-imunes dirigidas por células Th1. Alguns estudos como de Amaral (2011) realizados recentemente, mostram que a importância biológica Th17/IL-17A na patogênese dessas doenças são tão importantes quanto a ação pró-inflamatória de perfil Th1 e, ainda demonstram que indivíduos com polimorfismos no receptor de IL-23 (IL-23R) estão relacionados com maior probabilidade de desenvolver doenças auto-imunes. Sendo assim, sugere-se que a IL-17A seja um possível alvo terapêutico no tratamento de doenças auto-imunes/inflamatórias mediadas por células T.

O que nessa primeira análise se observa em nosso estudo com o *Vírus Oropouche* o papel relevante de modulação das citocinas de perfil Th17, visto que os grupos dos não respondedores e dos respondedores tardios possuem maior presença de IL-17A e IL-23 em relação aos outros grupos.

Assim, tal fato pode dar-se devido a estas citocinas com perfil Th17 estarem modulando a infecção para um quadro inflamatório, e por isso, estes pacientes apresentaram tal elevação, juntamente com níveis elevados das citocinas com perfil Th1, principalmente IFN- α e IFN- γ .

Lazarevic et al (2011) demonstraram que a deficiência T-bet *in vitro* promove a produção da IL-17A, promovendo assim a diferenciação das células T; foi demonstrado ainda que as células produzidas *in vitro* podem ser estimuladas através da regulação e transcrição de citocinas IL-17A em Th0-Th1 e células com perfil Th17. Por sua vez, Huber et al (2011) questionam que ainda não se conseguiu

identificar e criar com total efetividade mecanismos que controlem diretamente a patogenia em citocinas Th17; de acordo com o estudo dos autores, as células Th17 sejam controladas através da IL-10.

O aumento da IL-17A, bem como a IL-23 conforme demonstrado nos resultados obtidos do estudo com o *Vírus Oropouche* está de acordo com trabalho realizado por Lazaravec et al (2011) que sugere que a expressão de citocinas com perfil Th17 seja uma reação à inflamação que está sendo medeada por citocinas com perfil Th1.

Em adição de acordo com Martins et al (2007), em estudo sobre a ativação da rede de citocinas em arbovírus, demonstraram um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como IL-6, TNF- α , e IL-8 (CXCL8), determinando um perfil tendencioso para Th1, apresentando assim desfavoráveis resultados em pacientes com infecções mais severas por arbovírus.

Bozza et al (2009) que também realizaram estudos relacionados aos arbovírus, demonstraram que níveis elevados de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-4 (Th1) inclusive de IL-17 (Th17), são produzidos em casos graves de dengue, quando comparados com pacientes que apresentaram formas mais brandas da doença, os quais produziam níveis mais modestos dessas citocinas. Além disso, esses autores mostraram que níveis elevados de TNF- α , IL-8, IL-1 β (Th1), em detrimento de citocinas do perfil Th2, são encontrados no soro de pacientes que apresentaram sintomas graves de dengue e estão associadas com trombocitopenia e hipotensão.

Desta forma, deve-se recordar que as células com perfil Th1 facilitam a resposta imune celular ou citotóxica mediante a produção das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α , enquanto as células com perfil Th2 secretam, principalmente, IL-4, IL-5 e IL-10, que auxiliam os linfócitos B a produzirem anticorpos, facilitando a resposta imune humoral dirigida contra agentes infecciosos (MITELMAN et al., 2009).

Como visto em nosso estudo, os indivíduos respondedores à infecção por Oropouche, desde a 1ª coleta (respondedores precoces), apresentaram aumento na síntese de IL-4 e IFN- γ . Porém, apresentam déficit na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (Th1), bem como déficit de IL-10, que é produzida por linfócitos com perfil Th2 e tem função inibitória sobre a produção de IFN- γ e IL-2, regulando negativamente a imunidade celular via resposta Th1.

Neste caso, a soroconversão precoce induz um perfil de citocinas séricas diferente do perfil observado na soroconversão tardia, apesar de ambos terem lacunas na produção de citocinas pró-inflamatórias.

A IL-5 é produzida pela subpopulação Th2 de linfócitos T CD4+ e por mastócitos ativados. Essa citocina é um ativador de eosinófilos e serve como a ligação entre a ativação dos linfócitos T e a inflamação eosinofílica na tentativa de regular a inflamação. Por isso, os níveis elevados de IL-5 encontrados neste estudo, expressos nos pacientes respondedores tardios e respondedores precoces prolongados à infecção pelo *Vírus Oropouche*, reforçam a importância desta citocina na síntese de IgA, cujos níveis séricos elevados demonstraram maior suscetibilidade a doenças infecciosas, como por exemplo as causadas por arbovírus (MITELMAN et al., 2009).

A IL-5 pode estar relacionada também com o fenômeno da soroconversão (Fig. 6), esse achado pode sugerir que a soroconversão esteja relacionada à incapacidade de produção de citocinas Th1, como o IFN- γ e a IL-6, porém com a capacidade de aumentar a síntese de IL-5 (Th2) (Figura 5B).

Na figura 9, do estudo com o *Vírus Oropouche*, se observa a relação entre o perfil de citocinas séricas de indivíduos respondedores precoces e os títulos de anticorpos, e se demonstra de modo geral que os indivíduos que soroconverteram na 1ª coleta e que apresentam títulos de anticorpos IH com títulos inferiores ou iguais a 320, apresentaram lacunas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6).

Quanto à sintomatologia investigada, febre, calafrios, cefaléia e tontura, que são os sinais e sintomas mais apresentados/relatados por pacientes infectados com o *Vírus Oropouche*, o estudo aqui apresentado demonstrou que as manifestações clínicas são parecidas com as manifestações causadas por outros arbovírus, inclusive com vacinas como é o caso dos estudos provenientes da vacina da febre amarela (SILVA et al., 2010).

Observa-se também que a presença desses sintomas específicos, quando analisados separadamente e posteriormente em conjunto, também esteja relacionada ao aumento da produção de IL-5 (Fig. 10, 11, 12, 13 e 14), destacando que em todos os casos quando da manifestação dos sintomas, essa citocina apareceu alterada. Ressalta-se que essa constatação é um achado e merece ser melhor estudado, uma vez que como já citado anteriormente, existem indícios dessa

citocina estar relacionada com infecções provocadas por vírus, inclusive por arbovírus.

De forma geral, no presente estudo com o *Vírus Oropouche*, com exceção das citocinas IL-6 e IL-1 β , nos indivíduos com tontura, a análise dos quatro sintomas (febre, calafrios, cefaléia e tontura) simultaneamente demonstrou o mesmo perfil descrito quando esses sintomas/sinais analisados separadamente.

Percebe-se também que em geral, os indivíduos que apresentaram esses sintomas tiveram uma expressão aumentada de citocinas do perfil Th1, quando comparado aos que não apresentaram os sintomas o que confirma a manutenção de um padrão aumentado na expressão desses analitos séricos em soros humanos quando da infecção pelo *Orthobunyavirus Oropouche*.

Este estudo demonstrou ainda que na maioria dos grupos estudados, existe um aumento considerável do IFN- α , bem como das citocinas moduladoras IL-17A e IL-23, e principalmente da reguladora IL-4, perante a existência da infecção pelo *Vírus Oropouche*, trazendo em evidência uma relação direta com as infecções virais e a resposta imune do indivíduo. Silva et al (2011) ao realizar um estudo com a vacina da febre amarela, concluíram que a resposta imune predominante do tipo balanceada com síntese de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, que envolvam tanto células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa, parece ser essencial para a indução de uma resposta imune efetiva e segura após a vacinação antiamarílica.

Os IFNs estão associados como mediadores da resposta imune inata inicial a várias infecções virais. Eles apresentam propriedades biológicas diversas, incluindo efeitos antivirais e imunomoduladores (PLATANIAS et al., 1996; STARK et al., 1998).

Segundo Grandvaux et al (2002) os IFNs, de modo geral estão diretamente associados na indução da resistência às infecções virais por ativar vias intracelulares não citolíticas, que atenuam a infecção por meio da limitação da dispersão viral. Outros estudos demonstraram também que os IFNs α e β protegem as células contra o *Vírus Dengue* em infecções experimentais *in vitro* porque tem a capacidade de inibir a infecção pelo vírus, por prejudicar significativamente a produção ou a estabilidade do RNA viral, do antígeno viral intracelular, e dos vírus secretados para o sobrenadante da cultura celular (DIAMOND et al., 2000), e que o

IFN- α tem ainda a capacidade de limitar a replicação do *Vírus Dengue* no sistema nervoso central de camundongos (*in vivo*) (SHRESTA et al., 2004).

Barros et al (2009) durante seus estudos com outros flavivírus obtiveram resultados semelhantes, tendo sido demonstrado pelos autores que diferentemente de outras citocinas, o IFN- α produzido pelos macrófagos teve sua produção consideravelmente aumentada após 24 h de infecção pelos VBSQ, FA e VESL, em comparação com as células não-infectadas.

Esses dados supra citados talvez possam explicar no presente estudo com o *Vírus Oropouche*, o fato de os grupos dos não respondedores e dos respondedores tardios, apresentarem consideráveis elevações nos níveis de expressão de IFN- α e IFN- γ mediante a infecção por esse vírus.

Por outro lado, os resultados da presente pesquisa com o *Vírus Oropouche* podem ser corroborados ainda, por estudos realizados por Zarife et al (2011) que identificaram as citocinas presentes em doadores de sangue soropositivos para o HCV, identificando-os como baixos, médios e altos produtores de citocinas; esses autores observaram que há também uma relação particular entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras e a presença deste vírus.

Os dados obtidos nesta tese proporcionaram um melhor entendimento em relação a resposta imune citocínica em infecções humanas pelo *Vírus Oropouche*, permitindo-nos evidenciar que ocorreram alterações na expressão das citocinas séricas quando os indivíduos foram infectados, e que os mesmos apresentaram ainda variações nos perfis dessas citocinas.

Contudo há a necessidade de se investigar também as variações da resposta imunológica separando detalhadamente o perfil da amostra de acordo com sexo e faixa etária para se estabelecer em detalhes as variações citocínicas, bem como a análise da resposta imune por indução inata ou adaptativa.

Ressalta-se ainda que esta pesquisa serve como base para estudos futuros que possam contribuir para elucidar o mecanismos que envolvem a patogênese desse vírus em humanos, processo esse de grande importância para se estudar novas abordagens para o tratamento da infecção e desenvolvimento de novas drogas e medidas terapêuticas específicas.

10 CONCLUSÕES

1. Existe na resposta imune do indivíduo infectado pelo VORO um padrão de síntese de citocinas pró-inflamatórias, moduladoras e reguladoras, de caráter misto, com predomínio de eventos pró-inflamatórios (Th1).
2. De acordo com os resultados obtidos pode ser observado que os eventos pró-inflamatórios com perfil de resposta imune Th1, foram possivelmente modulados por citocinas de perfil Th17.
3. Foi demonstrado que a infecção pelo VORO altera a produção de citocinas nos indivíduos analisados com ênfase especial à citocinas pró-inflamatórias IFN- α e IFN- γ e as moduladoras IL-17A e IL-23, que alteraram consideravelmente e consecutivamente mediante a presença do vírus.
4. Demonstra-se o aumento na expressão da citocina reguladora IL-5 em pacientes que manifestaram os sintomas específicos para a infecção pelo *Vírus Oropouche* (febre, calafrios, cefaléia e tontura), sugerindo este sinal estar associado diretamente à patogênese do vírus.
5. Os indivíduos infectados pelo *Vírus Oropouche* que apresentaram qualquer sintoma da Febre do Oropouche devem ser melhor estudados, tendo a necessidade de investigar em especial os perfis de quimiocinas expressas por esses pacientes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 580 p. 6a Edição.

ABBAS, A. K., MURPHY, K. M., SHER, A. - **Functional diversity of helper T lymphocytes** - D., and Mason, D.- **Evidence that the T cell repertoire of helper T lymphocytes**. Nature - p.383, 787–793, 1996.

ALMEIDA, C. M. O.; LIMA, T. A.; CASTRO, D. B.; TORRES, K. L.; BRAGA, W. S.; MAGALHÃES, V. P.; CARVALHO, A. T.; MARTINS-FILHO, O. A.; MALHEIROS, A.- **Immunological/Virological Peripheral Blood Biomarkers and Distinct Patterns of Sleeping Quality in Chronic Hepatitis C Patients - Scandinavian Journal of Immunology**. Blackwell Publishing Ltd. Scandinavian Journal of Immunology 73, 486–495, 2011.

AMARAL, T. - **Immunopathogenesis of psoriasis** - Archives of Virology, v. 174, p. 189-285, 2011.

ANDERSON, C. R.; SPENCE, L.; DOWNS, W. G.; AITKEN, T. H. **Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies**. Am. J. of Trop. Med. and Hyg., v. 10, n. 1, p. 574- 578, 1961.

ANSEL, K. M.; LEE, D. U.; RAO, A. - **An epigenetic view of helper T cell differentiation**. Nat Immunol. 2003; 4:616-23.

AQUINO, V. H.; MORELI, M. L.; MORAES-FIGUEIREDO, L. T. **Analysis of Oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbor an important role for the polymerase activity**. Archives of Virology, v. 148, p. 19-28, 2003.

AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. **Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment**. Journal of Virological Methods, v. 115, p. 51-57, 2004.

ARAÚJO, R.; DIAS, L. B.; ARAUJO, M. T. F.; PINHEIRO, F.; OLIVA, F. P. **Alterações ultra-estruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (tipo BEAN 19991)**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo - v. 20, p. 45-54, 1978.

AVILA-AGUERO, M. L., AVILA-AGUERO, C. R.; UM, S. L.; SORIANO-FALLAS, A.; CAÑAS-COTO, A.; YAN, S. B - **Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. Cytokine-** v. 27, n. 6, p. 173-179, 2004.

AZEREDO E. L.; ZAGNE, S. M.; SANTIAGO, M. A.; GOUVEA, A. S.; SANTANA, A. A.; NEVES-SOUZA, P. C.; NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; KUBELKA, C. F - **Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. Immunobiology** - v. 204, p. 494-507, 2001.

AZEVEDO, R. S. S., NUNES, M. R. T, CHIANG, J. O., BENSABATH, G., VASCONCELOS, H. B., PINTO, A. Y. N., MARTINS, L. C., MONTEIRO, H. A. O., RODRIGUES, S. G., VASCONCELOS, P. F. C. - **Reemergence of Oropouche Fever, Northern, Brazil** - Emerging Infectious Disease, v. 13, p. 912-915, 2007.

BARROS, V. E. D.; FERREIRA, B. R.; LIVONESI, M.; FIGUEIREDO, L. T. M.- **Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with brazilian flaviviruses-** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 51, n. 3, p. 141-147, 2009.

BARROS V. E. D., SAGGIORO, F. P.; NEDER, L.; FRANÇA, R. F. O.; MARIGUELA, V.; CHÁVEZ, J. H.; PENHARVEL, S.; FORJAZ, J., FONSECA, B. A. L., AND FIGUEIREDO, L. T. M. **An Experimental Model of Meningoencephalomyelitis by Rocio Flavivirus in Balb/C Mice: Inflammatory Response, Cytokine Production, and Histopathology.** Am J Trop Med Hyg. 2011. 1; 85(2): 363–373.

BEDIN, F. - **Le Brésil, une terre d'élection pour les arboviroses?** - Med. Trop., v. 67, p. 281-287, 2007.

BILLATE, A. M. **Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas.** TEMAS DE REUMATOLOGIA CLÍNICA - VOL. 8 - Nº 3 - SETEMBRO DE 2007.

BISHOP, D. H. L.; SHOPE, R. E. Bunyaviridae. In: FRAENKEL-CONTRAT, H.; WAGNER, R. R. (eds.)- **Comprehensive Virology** - New York: Plenum Press, p. 1151 – 1160, 1979.

BISHOP, D. H.; CALISHER, C. H.; CASALS, J.; CHUMAKOV, M. P.; GAIDAMOVICH, S. Y.; HANNOUN, C.; LVOV, D. K.; MARSHALL, I. D.; OKER-BLOM, N.; PETTERSSON, R. F.; PORTERFIELD, J. S.; RUSSELL, P. K.; SHOPE, R. E.; WESTAWAY, E. G. - **Bunyaviridae.** - Intervirology, v. 14, p. 125–143, 1980.

BOULOY, M. - **Bunyaviridae: genome organization and their replication strategies.** Advances in Virus Research, v. 40, p. 235-266, 1991.

BORBOREMA, C. A. T.; PINHEIRO, F. P.; ALBUQUERQUE, B. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; DOURADO, H. V. - **Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche no Estado do Amazonas.**- Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 24, p.132-139, 1982.

BOZZA, F. A.; CRUZ, O. G.; ZAGNE, S. M.; AZEREDO, E. L.; NOGUEIRA, R. M.; ASSIS, E. F.; BOZZA, P. T. E KUBELKA, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients.: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. BMC Infect. Dis. 886, 2008.

BOZZA, F. A. SHAH, A. M. WEYRICH, A. S. ZIMMERMAN, G. A. Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 40 (2): 123-134, 2009.

BRAGA, E. L.; MOURA, P.; PINTO, L. M.; IGNACIO, S. R.; OLIVEIRA, M. J.; CORDEIRO, M. T.; KUBELKA, C. F.- **Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever-** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96, p. 229-232, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. - **Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Departamento de Monitoramento e Avaliação da Gestão do SUS.**- Painel de Indicadores do SUS. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. n. 1, p. 26-27.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue- **Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011-** Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. - **Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores** - In: Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 375-393.

BUCHEN-OSMOND, C. Bunyaviridae. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3.** ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, AZ, USA, 2003 p. 853

CACEDA, E. R.; KOCHER, T. J. - **Application of modified shell vial culture procedure for arbovirus detection** - PLoS ONE, v. 2, n. 10, p. e 1034, 2007.

CALISHER, C. H. History, classification, and taxonomy of viruses in the Family *Bunyaviridae*. In: ELLIOTT, R. M. (ed.). **The *Bunyaviridae***. New York: Plenum Press, p.1-18, 1996.

CHADHA K.C.; AMBRUS JR, J. L Jr.; DEMBINSKI, W.; AMBRUS J. L - . **Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy** - Exp Biol Med., 229:285-90, 2004.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. **Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak** - J. Med. Res. v. 123, n. 1, p. 25-30, 2006.

CHAVEZ, R.; COLAN, E.; PHILIPS, I. - **Fiebre de Oropouche em Iquitos: reporte preliminar de 5 casos** - Rev. de Farm. y Terap., v. 2, p. 12-14, 1992.

CHEN, L.C.; LEI, H. Y.; LIU, C.C.; SHIESH, S. C.; CHEN, S. H.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; WANG, S. T.; SHYU, H. W.; YEH, T. M.- **Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients.** - Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 74, n. 1, p. 142-147, 2006.

CLERX-VAN HAASTER, C. M.; AKASHI, H.; AUPERIN, D.D.; BISHOP, D.H.L. - **Nucleotide sequence analyses and predicted coding of bunyavirus genome RNA species-** *Journal of Virology*- v. 41, p. 119-128, 1982a.

CLERX-VAN HAASTER, C. M.; CLERX, J. P. M.; USHIJIMA, H.; AKASHI, H.; FULLER, F.; BISHOP, D. H. L. - **The 3' terminal sequences of bunyaviruses and nairoviruses (*Bunyaviridae*). Evidence of end sequence generic differences within the virus family** - *Journal of General Virology*, v. 61, p. 289, 1982b.

COOKE, A.; ZACCONE, P. ; RAINE, T, PHILLIPS, JM. ; DUNNE DW - **Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace?** - Trends Parasitol., 20:316-21, 2004.

CRUZ, A. C. R.; PRAZERES, A. S. C.; GAMA, E. C.; LIMA, M. F.; AZEVEDO, R. S. S.; CASSEB, L. M. N. C.; NUNES NETO, J. P.; MARTINS, L.C.; CHIANG, J.O.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. C. - **Vigilância sorológica para arbovirus em Juruti, Pará, Brasil.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 25 (11): 2517-2523, nov, 2009.

D'AMBROSIO, D.; SINIGAGLIA, F. - **Chemokines and their receptors: trafficking cues for Th1 and Th2 cells** - *European Cytokine Network* 11: 495–496, 2000.

DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; HERVÉ, J.-P.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; SÁ FILHO, G. C. e PINHEIRO, F. P. - **Modifications of arbovirus ecoepidemiology in Tucuruí, Pará, Brazilian Amazonia, related to the construction of a hydroelectric dam.** In: Arbovirus Research in Australia. *Proceedings of the 5th Symposium of the Queensland Institute of Medical Research*, Brisbane: Queensland Institute of Medical Research ed. p. 124-135, 1989.

DESREUMAUX, N. N. - **Arbovirus eco-epidemiology in cases of epidemics** - The Am. J. of Trop. Med. and Hyg.- v. 77, n. 8, p. 105-234, 2010.

DIAMOND, M. S.; ROBERTS, T. G.; EDGIL, D.; LU, B.; ERNST, J.; HARRIS, E. - **Modulation of dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons** - Journal of Virology, v. 74, n. 11, p. 4957–4966, 2000.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 (IL-1). In: THOMSON, A. W. **The cytokine handbook**. 2. ed. New York: Academic Press, 1994. p. 31-56.

DIXON, K. E.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; LLEWELLYN, C. H. - **Oropouche vírus. II. Epidemiological observation during na epidemic in Santarém, Pará, Brazil, in 1975.** - The Am. J. of Trop. Med. and Hyg. v. 30, n. 1, p. 161-164, 1981.

DUTARY, B. E.; PETERSEN, J. L.; PERALTA, P. H.; TESH, R. B. - **Transovarial Transmission of Gamboa Virus in a Tropical Mosquito, *Aedeomyia squamipennis*.** - American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 40, n. 1, p. 108–113, 1989.

ELLIOTT, R. M. - **Emerging Viruses: The *Bunyaviridae*** - Molecular Medicine, v. 3, n. 9, p. 572 – 577, 1997.

_____. **Bunyaviruses:** general features. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. (Eds.). *Encyclopedia of Virology*. 3. ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2008. p. 391 – 399.

_____. **Bunyaviruses and climate change** - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 15, n. 6: p. 510 – 517, 2009.

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. - **Apoptosis: an innate immune response to virus infection-** Trends Microbiol., v. 7, n. 4, p.160-165, 1999.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. - **Virus taxonomy – eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** - San Diego: Elsevier Academic Press, p. 1164, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. - **Vírus brasileiro da família *Bunyaviridae*** - Medicina, Ribeirão Preto, v. 32, p. 154-158, 1999.

_____. - **Febres hemorrágicas por vírus no Brasil** - Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop., v. 39, n. 2, p. 203-210, 2006.

_____. **Emergent arboviruses in Brazil** - Ver. Soc. Bras. Med. Trop., v. 40, p. 224 – 229, 2007.

FILHO, A. C. **análise atual da descrição original de Kaposi**. Rev Brás Reumatol, v.25, n.1, p.25-27, 1985.

FOY, E.; LI, K., SUMPTER JR, R.; LOO, YUEH-MING; JOHNSON, C. L.; WANG, C.; FISH, P. M.; YONEYAMA, M.; FUJITA, T.; LEMON, S. M.; GALE, J. R. M. - **Control of antiviral defenses through hepatitis C vírus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling** - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 102, n. 8, p. 2986-2991, 2005.

FREITAS, R. B.; PINHEIRO, F. P.; SANTOS, M. A. V., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; FREITAS, E. N. **Epidemia de vírus Oropouche no leste do estado do Pará** - in: Internacional Symposium On Tropical Arboviruses And Hemorrhagic Fevers, 1982, Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 419-439, 1982.

GAVRILOVSKAYA, I. N.; BROWN, E. J.; GINSBERG, M. H.; MACKOW, E. R. - **Celular entry of Hantavirus which hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by β 3-integrins**- J. Virol., v. 73, n. 5, p. 3951-3959, 1999.

GIBBONS, A. - **Where are “new” diseases born?** - Science, v. 261, p. 680-681, 1993.

GUBLER, D. J. **Resurgent vector-borne diseases as a global health problem**. Emerg. Infect. Dis., v. 4, n. 3, p. 442-450, 1998.

_____. **The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems**. Arch. Med. Res., v. 33, p. 330-342, 2002.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 639p. 14ª Edição.

GONZALEZ-SCARANO; NATHANSON, N - **Bunyaviridae** - In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (eds). *Virology*. 3. ed. New York: Raven Press, p.1473 – 1504, 1996.

GRANDVAUX, N. B.; TENOEVER, B. R. A. B; SERVANT, M. J. A. B.; HISCOTT, J. B. C. - **The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion** - *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 15, n. 3, p. 259-267, 2002.

HASEGAWA, H.; SATAKE, Y.; KOBAYASHI, Y- **Effect of cytokines on Japanese encephalitis virus production by human monocytes** - *Microbiol. Immunol.*, v. 34, p. 459-466, 1990.

HOBER, D.; POLI, L.; ROBLIN, B.; GESTAS, P.; CHUNGUE, E.; GRANIC, G; IMBERT, P.; PECARERE, J. L.; VERGEZ-PASCAL, R.; WATTRE, P.; MANIEZ-MONTREUIL, M. - **Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients.** - *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 48, p. 324-331, 1993.

HOOFNAGLE, J. H - **Therapy of acute and chronic viral hepatitis-** *Adv. Intern. Med.*, v. 39, p. 241-275, 1994.

HOCH, A. L.; ROBERTS, D. R.; PINHEIRO, F. D. P. - **Breeding sites of *Culicoides paraensis*, and other options for control by environmental management.-** *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 3, p. 284-293, 1986.

HUBER, S.; GAGLIANI, N.; ESPLUGUES, E.; O'CONNOR JR, W.; HUBER, F.; CHAUDNRY, A.; KAMANAKA, M.; KOBAYASHI, Y.; BOOTH, C.J.; RUDENSKY, A.Y.; RONCAROLO, M.G.; BATTAGLIA, M.; FLAVELL, R.A- **Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3– and Foxp3+ Regulatory CD4+ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner** - *Rev. Immunity* 34, 554–565, 2011.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2005 pp.1162 pp

INABA, Y., KUROGI, H., OMORI, T. - **Akabane disease: epizootic abortion, premature birth, stillbirth and congenital arthrogryposis hydranencephaly in cattle, sheep and goats caused by Akabane virus** - *Australian Veterinary Journal*, v. 51, p. 584 – 585, 1975.

ISHAK, K.G.; WALKER, D.H.; COETZER, J.A.; GARDNER, J.J.; GORELKIN, L- **Viral hemorrhagic fevers with hepatic involvement: pathologic aspects with clinical correlations-** Prog. Liver Dis., v. 7, p. 495-515, 1982.

JANEWAY, C. A. Jr. - **How the immune system protects the host from infection-** Microbes Infect., 3:1167-71, 2001.

JUFFRIE, M.; MEER, G. M. vd; HACK, C. E.; HAASNOOT, K.; VEERMAN, S. A. J. P.; THIJS, L. G - **Inflammatory mediators in dengue virus infection in children:interleukin-6 and its relation to c-reactive protein and secretory phospholipase A2-** Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 65, n. 1, p. 70-75, 2001.

KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviroses Including Certain Other Viruses of Vertebrates**, 3. ed. San Antonio, USA: The American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 1985. 1141pp.

KINNEY, R. M., CALISHER, C. H - **Antigenic relationships among Simbu serogroup (*Bunyaviridae*) viruses-** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 30, p. 1307-1318, 1981.

KRAKAUER, T.; LEDUC, J. W.; KRAKAUER, H.- **Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in hemorrhagic fever with renal syndrome-** . Viral Immunol. v. 8, n. 2, p. 75-79, 1995.

KURANE, I.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; MEAGER, A.; ENNIS F. A. - **High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection-** Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 48, p. 222-229, 1993.

LAZAREVIC, V.; CHEN, X.; SHIM, J. H.; HWANG, E.S.; JANG, E.; BOLM, A. N.; OUKKA, M.; KUCHOO, V.K.; GLIMCHER, L - **T-bet represses Th17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgt.** Nat. Immunology, 12 (1): 96-104, 2011.

LIBRATY, D. H. YOUNG, P. R. PICKERING, D. ENDY, T. KALAYANAROOJ, S. GREEN, S. VAUGHN, D. W. NISALAK, A. ENNIS, F. A. ROTHMAN, A. L.- **High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early - in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever.** J. Infect. Dis. 186 (8): 1165-8. 2002.

LIN, REN-JYE.; LIAO, CHING-LEN.; LIN, ELONG.; LIN, YI-LING - **Blocking of the Alpha Interferon-Induced Jak-Stat Signaling Pathway by Japanese Encephalitis Virus Infection** - Journal of Virology, v. 78, n. 17, p. 9285-9294, 2004.

LINLEY, J. R.; HOCH, A. L.; PINHEIRO, F. P. - **Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health** - J. Med. Entomol., v. 20 n. 4, p. 347-64. 1983.

LIVONESE, M. C.; DE SOUZA, R. L.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, L. T. - **In vitro and in vivo studies of ribavirin action on Brazilian Orthobunyavirus**- Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 75, n. 5, p. 1011-1016. 2006.

LIVONESE, M. C.; DE SOUZA, R. L.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, L. T. - **In vitro and in vivo studies of the Interferon-alpha actiona on distinct Orthobunyavirus**.- Antiviral Res., v. 75, n. 2, p. 121-128, 2007a.

LIVONESE, M. C.; MORO DE SOUZA, R. L.; MORAES FIGUEIREDO, L. T. - **In vitro study of antiviral activity of mycophenolic acid on Brazilian Orthobunyavirus** - Intervirology, v. 50, n. 3, p. 204-8. 2007b.

LE DUC, J. W.; HOCH, A. L.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. - **Epidemic Oropouche vírus disease in northern Brazil** - Bulletin of the Pan American Health Organization, v. 15, p. 97-103, 1981.

LE DUC, J. W.; PINHEIRO, F. P. Oropouche fever. In: MONATH, T. P (ed.)- **The Arboviruses: epidemiology and ecology**- Boca Raton: CRC press, 1988. p. 1-14.

LUDWIG, G. V.; ISRAEL, B. A.; CRISTENSEN, B. M.; YUILL, T. M.; SCHULTZ, K. T- **Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells** - Virology, v. 181, p. 564-571, 1991.

MACHADO, P.; ARAUJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E - **Immune response mechanisms to infections** - An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez., 2004.

MARTINS, M. A.; SILVA, M. L.; SANTOS, M. E.; RIBEIRO, J. G. L.; MAGALHÃES, V. P.; MARCIANO, A. P.; HOMMAH, A.; KROONH, E. G.; CARVALHO, A. T.; MARTINS-FILHO, O. A. - **Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination** - Rev Innate immunity and 17DD YF vaccination, Il rights reserved. doi:10.1016/j.vaccine. 2007. 12.035.

MARTINS, L. C.; DINIZ, J. A. P.; SILVA, E. V. P.; BARROS, V. L. R. S.; MONTEIRO, H. A. O., AZEVEDO, R. S. S., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. - **Characterization of Minaçu vírus (Reoviridae: 131 Orbovirus) and pathological changes in experimentally infected newborn mice** - International Journal of Experimental Pathology, v. 88, p. 63-73, 2007.

MANGIAFICO, J. A.; SANCHEZ, J. L.; FIGUEIREDO, L. T.; LEDUE, J. W.; PETERS, C. J. - **ISOLATION of a newly recognized Bunyamwera serogroup virus from a febrile human in Panama**- Am. J. Trop. Med. Hyg. v. 39, p. 593-596, 1988.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo, Atheneu, 2001. 78 pp.

MERTZ, G. J. - **Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses** - In: RICHMAN D. D.; WHITLEY R. J.; HAYDEN, F. G.(eds.). Clinical virology. New York: Churchill-Livingstone, 1997. p. 943-972.

MITELMAN, A. K.; BUCCHERI, V.; PRACCHIA, L. F.; RUBENS, C. V.; POPPE, S.; CAVALCANTE, A. M. M. P.; MONTEIRO, S. M. - **Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico**- Rev. Bras. Hematol. Hemoter; 31 (4):260-266, 2009.

MORELI, M. L.; AQUINO, V. H.; CRUZ, A. C. R.; FIGUEIREDO, L. T. M.- **Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-Nested-PCR** - J. Med. Virol., v. 66, p. 139-142, 2002.

MURPHY, F.A - **Emerging zoonosis** - Emerg. Infect. Dis., v. 4, p. 429-435, 1998.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. - In: **Veterinary Virology** - 3. ed. EUA: Academic Press, 1999, 629p

MORSE, S. S. **Emerging Viruses**. New York: Oxford University Press. 1993.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E. DÈSPRES, P. CEDILLO-BARRÓN, L. - **Innate Immune Response to Dengue Virus**- Arch. Med. Res. 36: 425-435, 2005.

NICHOL, S. T. - **Bunyaviridae** - In: KNIPE, D. M. FIELDS - **Virology** - Philadelphia: Lippincott-Williams, v. 2, p. 1603-1633, 2001.

NICHOL, S. T.; BEATY, B. J.; ELLIOTT, R. M.; GOLDBACH, R.; PLYUSNIN, A.; SCHMALJONH, C. S.; TESH, R. B. - **Family Bunyaviridae**. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, I. A. (eds.). **Virus**

taxonomy: eighth report of the international committee on taxonomy of viruses
- San Diego, California: Elsevier Academic Press. p. 695 – 716, 2005.

NGUYEN, T. H.; LEI, H. Y.; NGUYEN, T. L.; LIN, Y. S.; HUANG, K. J.; LE, B. L.; LIN, C. F.; YEH, T. M.; DO, Q. H.; VU, T. Q.; CHEN, L. C.; HUANG, J. H.; LAM, T. M.; LIU, C. C.; HALSTEAD, S. B - **Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles** - J. Infect. Dis., v. 189, p. 221-232, 2004.

NUNES, M. R. T.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; AZEVEDO, R. S. A.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C - **Oropouche virus isolation, southeast Brazil**- Emerging Infectious Diseases, v. 11, n. 10, p. 1610-1613, 2005b.

NUNES, M.R.T., VASCONCELOS, H.B., MEDEIROS, D.B.A., RODRIGUES, S.G., AZEVEDO, R.S.S., CHIANG, J.O., MARTINS, L.C., VASCONCELOS, P.F.- **A febre do Oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia Brasileira**- Cadernos de Saúde Coletiva, v. 13, p. 303-318, 2007.

PASCOAL, V. P. M - **Estudo Da Influência Da Infecção Por *Leishmania Chagasi* E Do Impacto Da Terapêutica Específica Eficaz No Perfil Da Resposta Imune Celular De Indivíduos Portadores De Leishmaniose Visceral** - Tese de doutorado Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular. Belo Horizonte 2005, p.212.

PEREIRA, J. L. **Citologias que dão vida**. São Paulo: Atlas, 2011.

PERU - **Ministério da Saúde**; NAMRID, 1994 - Informação pessoal.

PINHEIRO, F. P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O. R.; SHOPE, R.- **Epidemia de vírus Oropouche em Belém**- Revista do Serviço Especial de Saúde Pública, v. 12, n. 1, p. 13 - 23, 1962.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; BENSABATH, G. - **An outbreak of Oropouche disease in the vicinity of Santarém, Pará, Brasil**- Tropenmedizin und Parasitologie. Germany, v. 27, p. 213-223, 1976.

PINHEIRO, F. P.; HOCH, A. L.; GOMES, M. L. C.; ROBERTS, D. R - **Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*** - The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 30, n. 1, 172 - 176, 1981a.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; ISHAK, R.; FREITAS, R. B.; GOMES, M. L.; LE DUC, J. W.; OLIVIA, O. F. - **Oropouche vírus. I. A review of clinical, epidemiological and ecological findings**- The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 30, n. 1, p. 149 - 160, 1981b.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; GOMES, M. L. C.; LE DUC, J. W.; HOCH, A. L. - **Transmission of Oropouche virus from man to hamsters by midge *Culicoides paraensis***- Science, v. 215, n. 4537, p. 1251 - 1253, 1982a.

PINHEIRO, F. P.; ROCHA, A. G.; FREITAS, R. B.; OHANA, B. A.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; ROGÉRIO, J. S.; LINHARES, A. C - **Minigitis associated with Oropouche vírus infections** - Rev. do Inst. de Med. Trop. de São Paulo, v. 24, p. 246-251, 1982b.

PINHEIRO F. P - **Febre do Oropouche** - Jornal Brasileiro de Medicina, v. 44, n.4, p. 46-62, 1983.

PINHEIRO F. P. - **Virologia: introdução** - In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, p. 349-357, 1986.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A - **Arboviral Zoonoses. of Central and South America**. In: BERAN, G (ed.). Handbook of Zoonoses. Boca Raton: CRC Press, p. 214-217, 1994.

PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA A. P. A., VASCONCELOS, P. F. da C. Febre por Oropouche. In: LEÃO, R. N. Q. (ed). **Doenças infecciosas e parasitárias**. Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, p. 285-297, 1997.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Na overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and the neighbor countries. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Eds.). **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**- Belém: Instituto Evandro Chagas, p. 186 – 192, 1998.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. - **Oropouche fever**- In: FEIGIN, R. D. (Ed.). Textbook of pediatric infectious diseases. 5. ed., Philadelphia: Editora Saunders, p. 2418 – 2423, 2004.

PINTO, A. J.; MORAHAN, P. S.; BRINTON, M.; STEWART, D.; GAVEN, E. - **Comparative therapeutic efficacy of recombinant interferons- alpha-beta, and**

gamma against alphetogaviruses, bunyavirus, flavivirus, and herpesvirus infections - J. Interferon Res., v. 10, p. 293-298, 1990.

PINTO, L. M. O.; OLIVEIRA S. A.; BRAGA, E. L. A.; NOGUEIRA, R. M. R.; KUBELKA, C. F.- **Increased Pro-inflammatory Cytokines (TNF- α and IL-6) and Anti-inflammatory Compounds** - (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian Patients during Exanthematic Dengue Fever. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 94, n. 3, p. 387-394, 1999.

PLATANIAS, L. C.; UDDIN, S.; DOMANSKI, P.; COLAMONICI, O. R.- **Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and beta L subunits of the type I interferon receptor**- J. Biol. Chem., v. 271, p. 23630-23633, 1996.

QUARESMA, J. A. S. - **Arboviroses da Amazônia: estudo do mecanismo de morte celular e da resposta fenotípica do hospedeiro na febre amarela. 2003.**- 162 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade de São Paulo. São Paulo.

QUARESMA, J. A. S.; BARROS, V. L. R. S.; FERNANDES, E. R.; PAGLIARI, C.; TAKAKURA, C. F. H.; VASCONCELOS, P. F. da C.; ANDRADE JR, H. F. de.; DUARTE, M. I. S.- **Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever**- Acta Tropica, v. 94, p. 116–127, 2005.

QUARESMA, J. A. S.; DUARTE, M. I. S.; VASCONCELOS, P. F. da C.- **Midzonal lesions in yellow fever: A specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response** - Medical Hypotheses, v. 67, p. 618–621, 2006a.

QUARESMA, J. A. S.; BARROS, V. L. R. S.; PAGLIARI, C.; FERNANDES, E. R.; GUEDES, F.; TAKAKURA, C. F. H.; ANDRADE JR, H. F. de.; VASCONCELOS, P. F. da C.; DUARTE, M. I. S.- **Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity**- Virology, v. 345, p. 22 – 30, 2006b.

RACZ, M. L - **Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores** - In: Microbiologia. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 671-678.

RACHMAN, A. e RINALDI, I. **Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6.** Acta Med. Indones 38 (2): 105-108, 2006.

RAJU, R., KOLAKOFSKY, D - **The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within the nucleocapsid are based paired** - Journal of Virology, v. 63, p. 122-128, 1989.

RAVCOV, E. V.; NICHOL, S. T.; COMPANS, R. W. - **Polarized entry and release in epithelial cells of black creek canal** - J. Virol., v. 71, p. 1147-1154, 1997.

REIS, S. R. N. I.; SAMPAIO, A. L. F.; HENRIQUES, M. G. M.; GANDINI, M., AZEREDO, E. L., KUBELKA, C. F. - **AN IN VITRO MODEL FOR DENGUE VIRUS INFECTION THAT EXHIBITS HUMAN monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation**- Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, n. 8, p. 983-990, 2007.

ROBERTS, D. R.; HOCH, A. L.; DIXON, K. E.; LLEWELLYN, C. H. - **Oropouche virus. III. Entomological observations from three epidemics in Pará, Brazil, 1975** - Am. J. of Trop. Med. and Hyg., v. 30, n. 1, p. 165 -171,1981.

RODRIGUES, A. H. - **Desenvolvimento de um modelo experimental de infecção subcutânea por Vírus Oropouche em Hamster**- Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R., Fleischhauer K, Levings MK - **Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans**- *Immunol. Rev.* 212:28–50, 2006.

ROSSI, D.; ZLOTNIK A - **The biology of chemokines and their receptors** - Annu Rev Immunol. 18:217-42, 2000.

SAEED, M. F.; WANG, M.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F. C.; WEAVER, S.; SHOP, R. E.; WATTS, M. D.; TESH, B. R.; BARRET, A. D. T - **Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus** - Journal of Virology, v. 81, p. 743-748, 2000.

SAEED, M. F.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K.; SHOPE, R. E.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. T.- **Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay** - Journal of Clinical Microbiology. v. 39, n. 7, p. 2445 - 2452, 2001.

SANTOS, R. I. M. - **Vírus oropouche: estudo do mecanismo de entrada de células HeLa I e C6/36**, 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SANTOS, R. I. M. **Infecção experimental de camundongos BALB/c neonatos inoculados pela via subcutânea com vírus Oropouche**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SANTOS, R. I.; RODRIGUES, A. H.; SILVA, M. L.; MORTARA, R. A.; ROSSI, M. A.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. E ARRUDA, E - **Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification-** *Virus Res*, v. 138, n. 1-2, p.139-43, 2008.

SILVA, M. L.; ESPIRITO-SANTO, L. R.; MARTINS, M. A.; LEMOS, D. S.; MAGALHÃES, V. P.; CARMINHA, R. C.; MARANHÃO FILHO, P. A.; MARTINS, M. A.; MARTINS, R. M.; GALLER, R.; FREIRE, M. S.; MARCOVISTZ, R.; HOMMA, A.; TEUWEN, D. E.; SANTOS, M. E.; ANDRADE, M. C.; MARTINS-FILHO, O. A - **Clinical and Immunological Insights on Severe, Adverse Neurotropic and Viscerotropic Disease following 17D Yellow Fever Vaccination** - *Rev. Clinical And Vaccine Immunology*, vol.17 -, p. 118–126, Jan. 2010.

SILVA, M. L. - **Caracterização Da Resposta Vacinal Antiamarílica Em Crianças E Adultos, Utilizando O Modelo Panorâmico De Análise Imunofenotípica** - Tese de Doutorado apresentado à Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde-2011.

SILVA, M. L.; AZEVEDO, A.C.C.; BATISTA, M.A.; MARTINS, M.A.; AVELAR, R.S.; LEMOS, D.S.; CAMACHO, L.A.B.C.; MARTINS, R.M.; MAIA, M.L.S.; FARIAS, R.H.G.; FREIRE, M.S.; GALLER, R.; HOMMA, A.; RIBEIRO, J.G.L.; LEMOS, J.A.C.; MARTINS, M.A; SANTOS, S.M.E.; CARVALHO, A.T.; MARTINS-FILHO, O.A.- **Cytokine Signatures of Innate and Adaptive Immunity in 17DD Yellow Fever Vaccinated Children and Its Association With the Level of Neutralizing Antibody - Cytokine Signatures and Neutralizing Antibodies in YF-17DD Vaccinated Children. JID 2011:204 (15 September). 873** - Downloaded from jid.oxfordjournals.org at Fundação Oswaldo Cruz on August 17, 2011.

SCHLUNS, K. S., e LEFRANCOIS, L. - **Cytokine control of memory T-cell development and survival-** *Nat. Rev. Immunol.* 3, 269–279, 2003.

SHER, A., R. T.; GAZZINELLI, I. P.; CLERIC, M.O, M. KULLBERG, E. J.; PEARCE, J. A; BERZOVSKY, T. R; . MOSMANN, S. L; JAMES, H. R.; MORSE III, ; G. M. SHEARER. **Role of T cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection.** *Immunol. Rev.* 127:183-204, 1992.

SHEERAN, P.; HALL, G.M. - **Cytokines in anaesthesia** - *Br. J. Anaesth* 78: 201-19, 1997.

SCHMALJOHN, C. S.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerg. Infect. Dis.** v. 3, p. 95-104, 1997.

SCHMALJOHN, C. S.; PATTERSON, J. L- **Bunyaviridae and their replication.**
In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. (eds.) - Virology. New York: Lippincott – Raven, p. 1175 – 1194, 2001.

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. - **Bunyaviridae: the viruses and their replication** - In: FIELDS, B. et al. **Fundamental virology.** Philadelphia: Lipincott-Williams ; Wilkins,. p.1581-1602, 2001

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. - **Bunyaviridae: the viruses and their replication** - In: KNIPE, D. M. **Fields virology.** Philadelphia: Lipincott-Williams & Wilkins, v. 1, 2006.

SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S. T. - **Bunyaviridae** - In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. (eds.). **Virology.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,. p. 1741 – 1789, 2007.

SHRESTA, S.; KYLE, J. L.; SNIDER, H. M.; BASAVAPATNA, M.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. - **Interferon-Dependent Immunity Is Essential for Resistance to Primary Dengue Virus Infection in Mice, Whereas T- and B-Cell-Dependent Immunity Are Less Critical** - **Journal of Virology**, v. 78, n. 6, p. 2701-2710, 2004.

SMITH, J. F; PIFAT, D. Y. - **Morphogenesis of sanfly viruses (Bunyaviridae family)** - **Virology**, v. 121, p. 61-81, 1982.

STARK, G. R.; KERR, I. M.; WILLIAMS, B. R.; SILVERMAN, R. H.; SCHREIBER, R. D- **How cells respond to interferons-** . **Ann. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 227-264, 1998.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARLOW, T. G. - **Imunologia Médica** - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.49-52. 9ª Edição.

TARNOK, A.; HAMBSCH, J.; CHEN, R.; VARRO, R- **Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum-** **Clin. Chem.** v. 49, p. 1000 – 1002, 2003.

TAVARES-NETO, J.; ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F.; COSTA, J. M. L; ROSA, J. F.T; MARSDEN-. **Pesquisa de anticorpos contra arbovírus e o vírus**

vacinal da febre amarela em uma amostra da população de Rio Branco, antes e três meses após a vacina 17D. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.37, no.1, p.1-6, Fev 2004.

TIMBURY, M. C. - **Medical Virology**- 10. ed. London: Churchill Livingstone, 1994. 176p.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., NAKAUTH, C. M., VASCONCELOS, P. F. C - **Aspectos virológicos dos arbovírus.** In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical.** Belém: Instituto Evandro Chagas, 1986. p.365-373.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T.; MAGALHÃES, M. T. F.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; VASCONCELOS P. F. C.- **Epidemia de febre do Oropouche em Serra Pelada, Município de Curionópolis, Pará - 1994.** Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop., v. 29, p. 537-541, 1996.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PINHEIRO, F. P., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: Leão, R. N. Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: enfoque amazônico** - Belém. Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997. p. 207-226

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 the 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. (eds.). **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries.** Belém: Instituto Evandro Chagas, p.19-31, 1998.

TRISTAM G.; PARSLOW, D. P.; SITES, A. I.; TERR, J.B.I. **Imunologia Médica.** Guanabara Koogan 10ª Edição. 2004. 702 pg. cap. 45.

USHIJIMA, H.; KLIMAS, R.; KIM, S.; CASH, P.; BISHOP, D. H - **Characterization of the viral ribonucleic acids and structural polypeptides of anopheles A, Bunyamwera, Group C, California, Capim, Guama, Patois and Simbu bunyaviruses-** Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 29, p.1441-1452, 1980.

VASCONCELOS, H. B - **Epidemiologia Molecular Do Vírus Oropouche (Bunyaviridae: Orthobunyavirus) Na Amazônia Brasileira** - Dissertação apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e

Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – 2009. 140p.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; GUERREIRO, S. C.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. - **Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás**- Brasil. Rev. do Inst. de Med. Trop. de São Paulo, v. 31, p. 271 - 278, 1989.

VASCONCELOS P, F; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, - **Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. Ciência e Cultura**, v. 44, p. 117- 124, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., DÉGALLIER., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.- **Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergente and reemergence of arboviroses**- Cadernos de Saúde Pública, v. 17, p. 155-164, 2001.

VASCONCELOS, H. B.; AZEVEDO, R. S., CASSEB, S., NUNES-NETO, J. P., CHIANG, J. O., CANTUÁRIA, P. C., SEGURA, M. N. O., MARTINS, L. C., MONTEIRO, H. A. O., RODRIGUES, S. G., NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. - **Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates** -Journal of Clinical Virology, v. 44 p. 129-33, 2009.

VASCONCELOS, H. B.; NUNES, M. R. T.; CASSEB, L. M. N.; CARVALHO, V. L.; SILVA, E V. P.; SILVA, M. O. ; CASSEB, S. M. M.; VASCONCELOS, P. F. C. **Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil** - Emerging Infectious Diseases, v. 17, p. 800-806, 2011.

VITARANA T, SILVA, H.; WITHANA N, GUNASEKERA, C. - **Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever**- Ceylon Med. J. v. 36, p. 63-65, 1991.

VITHANOMSAT, S.; WASI, C.; HARINASUTA, C.; THONGCHAROEN, P.- **The effect of interferon on flaviviruses *in vitro*: a preliminary study** - Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth, v. 15, p. 27-31, 1984.

WAHL, S. M.; MC CARTNEY-FRANCIS, N.; MERGENHAGEN, S.E. - **Inflammatory and immunomodulatory roles TGF-beta**- Immunol. v. 10, p. 258-261, 1989.

WATTS, D. M.; PHILLIPS, I.; CALLAHAN, J. D.; GRIEBENOW, W.; HYAMS, K. C.; HAYES, C. G.- **Oropouche virus transmission in the Amazon river basin of Peru**- The Am. J. of Trop. Med. and Hyg. v. 56, n. 2, p. 148-152, 1997.

WEAVER, S. C. - **Vector biology in arboviral pathogenesis** - In: Viral Pathogenesis. New York: Lippincott Raven, 1997. p. 329-352.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T - **Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease**- . Nat. Rev., v. 2, p. 789 -801, 2004.

WEIDMANN, M.; RUDAZ, V.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; HUFERT, F.T. - **Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses** - J. Clin. Microbiol., v. 41, n. 7, p. 3299-3305, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 2007. **Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF):** Region of the Americas (by country and subregion). Week 52 (Update 6 July 2011). Disponível em: <http://www.paho.org/common/Display.asp?Lang=E&RecID=103897>>.

Acesso em: 07 junho de 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Arthropod-Born and Rodent-Born Viral Diseases. Geneva. **Technical Report Series**, n. 719, 1985.

ZAGO, T. - **Imunidade e Citocinas**. Rev. Saúde, Biologia e Vida. V. 2, n. XI, p. 41-88, 2010.

ZARIFE, M.A .; REIS, E. A.G.; MEIRA, G.; CARMO, T.M.A.; LOPES, G.B.; MALAFAIA, E.C.O.B.; SILVA, H.R.; SANTANA, N.; MARTINS-FILHO. O.A.; REIS, M.G. - **IL-8 Is Associated with Non-Viremic State and IFN- γ with Biochemical Activity in HCV-Seropositive Blood Donors** - Intervirology 54:87–96, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Cópia do Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos



Parecer de Aprovação nº 0027/2010
Protocolo CEP/IEC - Nº 0007/10
CAAE: 0008.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 22 de setembro de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Caracterização da resposta imune citocínica em infecções humanas por febre do oropouche”

Pesquisador Responsável: EUZÉBIO DE OLIVEIRA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**. Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B – Cópia do Parecer de Autorização do HEMOPA, para obtenção/concessão das amostras de sangue para controle negativo



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
CÂMARA SETORIAL DE POLÍTICAS SOCIAIS
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA
FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMOTERAPIA E HEMATOLOGIA DO PARÁ



Ofício Nº 080/2011 – GAPRE/HEMOPA

Belém, 09 de fevereiro de 2011.

Ao
Sr. Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Chefe da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS
Av. Almirante Barroso, 492 - Marco
CEP: 66.090-000 Belém-PA

Senhor Chefe:

Ao cumprimentá-lo, reportando-me ao ofício o qual solicita a cessão dos soros de doadores de sangue para respaldar pesquisa do projeto de doutorado do aluno Euzébio de Oliveira, informamos que serão concedidas as amostras de 0,5-1,0ml de soro de cerca de 100 doadores.

Na oportunidade, solicitamos que o doutorando Euzébio compareça ao Núcleo de Ensino e Pesquisa desta Fundação, dia 16/02/11 (quarta feira) às 11h, para as providências necessárias.

Atenciosamente,

Rosângela Braga

Chefe de Gabinete da Fundação HEMOPA

Fundação HEMOPA
Tv. Padre Eutíquio, 2109 – Batista Campos
Belém – Pa CEP 66033-000
Tel.: 91 3242 9100/ 3242-6905
www.hemopa.pa.gov.br

E-PROTOCOLO
GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
HEMOPA - Fundação Centro de Hemoterapia
e Hematologia do Pará
Nº 47044
1010211 Paula
Protocolista