



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ADRIANO DA PAIXÃO SOUTO

**REPLICAÇÃO VIRAL, PADRÃO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E
CINÉTICA DE MORTE CELULAR EM CULTURA PRIMÁRIA DE
CÉLULAS NEURAIS INFECTADAS PELO VÍRUS ROCIO**

BELÉM - PARÁ

2015

ADRIANO DA PAIXÃO SOUTO

**REPLICAÇÃO VIRAL, PADRÃO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CINÉTICA
DE MORTE CELULAR EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS
INFECTADAS PELO VÍRUS ROCIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Edna Cristina Santos Franco

BELÉM - PARÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Souto, Adriano da Paixão, 1991-

Replicação viral, padrão de expressão de citocinas e cinética de morte celular em cultura primária de células neurais infectadas pelo vírus Rocio / Adriano da Paixão Souto. – 2015.

Orientadora: Edna Cristina Santos Franco

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Arbovírus. 2. Arbovirose. 3. Encefalite.
4. Neurônios. 5. Citocinas. I. Título.

CDD 22. ed. 579.2562

ADRIANO DA PAIXÃO SOUTO

**REPLICAÇÃO VIRAL, PADRÃO DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CINÉTICA
DE MORTE CELULAR EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS
INFECTADAS PELO VÍRUS ROCIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Belém (PA), 13 de Julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco
IEC – Sessão de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
(Orientadora)

Prof^o. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena
UFPA – Instituto de Ciências Biológicas

Dr^a. Eliana Vieira Pinto da Silva
IEC – Sessão de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

Prof^o. Dr. Arnaldo Jorge Martins Filho
IEC – Sessão de Patologia

Prof^o. Dr. Agenor Valadares Santos – Suplente
UFPA – Instituto de Ciências Biológicas

Prof^a. Dr^a. Ana Cecília Ribeiro Cruz – Suplente
IEC - Sessão de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, pessoas cujos incentivos e cuidados me permitiram chegar onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor do Céu e da Terra, criador de tudo o que existe, pelas bênçãos que a todos os dias derrama sobre mim e minha família, dentre elas, minha aprovação no vestibular, minha graduação em Biomedicina e a conclusão do meu Mestrado em Biotecnologia.

Aos meus estimados pais, Claudio e Isolete Souto, aos quais atribuo toda a credibilidade pela minha formação acadêmica, profissional, pessoal e cidadã.

À minha ilustríssima avó, Raimunda Palheta de Souza Filha, que com suas orações e conselhos colaborou de sobremaneira para a minha formação acadêmica.

À Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, que, apesar dos laborosos processos burocráticos, me permitiu adquirir o grau de Mestre com excelência e confiabilidade.

À secretária da Pós-Graduação, Monalisa Lira, que facilita (e muito) a vida dos famigerados alunos da Biotecnologia.

À minha orientadora, Professora Doutora Edna Cristina Santos Franco, que com empenho, paciência e atenção, me ensinou muito e tornou possível a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Ao prezado Mestre Samir Casseb, que idealizou todo este projeto e me acompanhou de maneira especial durante todo o desenvolvimento da minha dissertação.

Ao Instituto Evandro Chagas, na pessoa dos doutores Elizabeth Santos e Pedro Vasconcelos, e todos os colaboradores da Sessão de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, em especial meus colegas: Daniele Henriques, Dr^o Arnaldo, Alice, Gustavo, Karla, Amarílis, Ana Claudia, Maria Helena, Dr^a Valéria, Dr^a Eliana, Maisa, Jamilla, Dr^a Lívia Casseb, Dr^a Ana Cecília, seu Pedro, dona Jane, dona Mari, Rose e dona Helena.

Aos meus queridos colegas de curso: Marcela, Francisco, Lillian, Kellen, Shirley, Marta e Lívia, que tornaram a Pós-Graduação muito mais leve e descontraída do que deveria ser.

Aos outros colaboradores: Bruno Martins, Paula Frade e Neide, que terão minha perpétua gratidão por tudo que fizeram por mim.

EPIGRAFE

*“Se nosso cérebro fosse tão simples a ponto de entendê-lo, seríamos tão tolos que
continuaríamos sem entendê-lo”.*

Jostein Gaarder

RESUMO

Os arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* (Família *Flaviviridae*) são responsáveis por considerável morbi-mortalidade, podendo causar quadros graves de encefalite, febre hemorrágica, hepatite e doença febril em vertebrados, incluindo humanos. O flavivírus Rocio (VROC) é de grande importância para a saúde pública no Brasil, pois representa uma grave ameaça de ocorrência de súbitos surtos de encefalite. A imunopatologia das encefalites causadas por flavivírus ainda não está completamente esclarecida e muitos aspectos inerentes à modulação das respostas imunes do SNC carecem por ser desvendados. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar o padrão de expressão gênica de citocinas em cultura primária de células neurais submetidas à infecção pelo vírus Rocio. Culturas primárias mistas (neurônio/glia), obtidas a partir de cérebros de camundongos isogênicos neonatos da linhagem BALB/c, foram inoculadas com o VROC (MOI igual a 2) no sétimo dia de cultivo, a confirmação da infecção foi feita por imunocitoquímica (anti-VROC). Quantificou-se a replicação viral nas culturas primárias infectadas, em função do período infeccioso, pelo método da titulação viral. O RNA celular total foi extraído e utilizado para a detecção de citocinas através da técnica de RT-qPCR em tempo real. O estudo demonstrou que cultura primária de células neurais constitui um bom modelo experimental para estudo de infecções do SNC pelo flavivírus Rocio. O VROC infectou eficientemente a cultura primária de células neurais gerando alterações citopatogênicas a partir do 2º dia p.i., momento em que se detectou maior título viral. A cultura primária infectada com o VROC sobreviveu até 7 dias p.i. e a quantificação da carga viral revelou uma cinética de replicação viral compatível com a cinética de morte celular da cultura infectada pelo VROC. Durante os cinco primeiros dias p.i. da cultura primária, houve redução da expressão gênica de INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β , não houve alteração na expressão de TNF- α e houve aumento na expressão de TGF- β no 1º, 3º e 5º dia p.i. Os achados deste estudo sugerem que o VROC tem a capacidade de regular negativamente a expressão de citocinas moduladoras das respostas imunes antivirais e inflamatórias e que, neste modelo experimental, a imunorregulação exercida pelo TGF- β predomina sobre a modulação das respostas imunes antivirais e inflamatórias, sendo necessários maiores estudos para elucidar a imunopatologia da infecção do SNC pelo VROC.

Palavras-chave: Flavivírus, cultura primária de células neurais, vírus Rocio e Citocinas.

ABSTRACT

Arboviruses belonging to the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae* family) are responsible for considerable morbidity and mortality, may cause severe cases of encephalitis, hemorrhagic fever, hepatitis and febrile disease in vertebrates, including humans. Rocio flavivirus (ROCV) is very important for public health in Brazil, as it represents a serious threat of occurrence of sudden encephalitis outbreaks. The immunopathology of encephalitis caused by flavivirus is not yet fully understood and many aspects involved in modulation of immune responses in the CNS need to be unraveled. Thus, the aim of this study was to analyze the pattern of gene expression of cytokines in primary culture of neural cells when exposed to infection with Rocio. Mixed primary cultures (neuron/glia), obtained from the brains of BALB/C lineage isogenic newborns mice were inoculated with ROCV (MOI equal to 2) on the seventh day of culture and confirmation of infection was made by immunocytochemistry (anti-VROC). Viral replication was quantified in infected primary cultures, depending on the infectious period, by viral titer method. Total cellular RNA was extracted and used for detection of cytokines by real time RT-qPCR techniques. The study showed that primary cultures of neural cells is a good experimental model for the study of CNS infections by Rocio flavivirus. ROCV efficiently infected the primary cultured neural cells leading to cytopathic changes from the 2nd day a.i., when it detected the higher viral titer. The ROCV-infected primary culture survived up to 7 days a.i. and quantification of viral load showed a viral replication kinetics compatible with cell death kinetics of culture infected by ROCV. During the first five days a.i. of the primary culture, there was reduction of IFN- α gene expression, IFN- β , IFN- γ and IL-1 β , there was no change in TNF- α expression and there was an increase in TGF- β expression in the 1st, 3rd and 5th day a.i.. The findings of this study suggest that ROCV has the ability to downregulate modulators cytokines of antiviral and inflammatory immune responses and, in this experimental model, immunoregulation exerted by TGF- β predominates over the modulation of inflammatory and antiviral immune responses, larger studies are needed to elucidate immunopathology of CNS infection by ROCV.

Keywords: Flavivirus, primary cultures of neural cells, Rocio virus and Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de patogenicidade dos arbovírus. Os arbovírus penetram no organismo hospedeiro através da picada do vetor e se replicam nas células teciduais e gânglios linfáticos próximos à área da picada. A seguir, alcançam a corrente sanguínea e se replicam nos órgãos do hospedeiro, de onde são lançados novamente na corrente sanguínea e atingem outros órgãos, incluindo o SNC.....	5
Figura 2. Esquema da estrutura dos flavivírus.	8
Figura 3. Esquema da organização do genoma dos flavivírus.	8
Figura 4. (A) Imunofluorescência Indireta de células VERO infectadas pelo VROC com 4 dias p.i. marcadas com anticorpo policlonal anti-VROC; (B) Imunofluorescência Indireta de células VERO infectadas pelo VROC com 4 dias p.i. marcadas com anticorpo policlonal anti-grupo B; (C) Imunofluorescência Indireta de células VERO não infectadas. (200x).	38
Figura 5. Titulação do Estoque Viral em placas de 6 poços feita em duplicata com oito diluições e controle negativo (C). Placas contáveis e isoladas observadas até a diluição 10^{-5} (seta).	38
Figura 6. (A) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais marcadas com anticorpo anti-NeuN; (B) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais marcadas com anticorpo anti-GFAP; (C) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais marcadas com anticorpo anti-Iba 1; (D) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais incubadas sem anticorpo primário, tratada como controle. (200x).....	39
Figura 7. Cultura primária de células neurais inoculadas com o VROC. (A) Controle, monocamada de células no 5º dia pós-inoculação com meio de cultivo NBA estéril; (B) Monocamada de células no 2º dia pós-inoculação com o VROC; (C) Monocamada de células no 7º dia pós-inoculação com o VROC. (200x).	41
Figura 8. (A) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais infectadas com o VROC e incubadas com anticorpo policlonal anti-VROC; (B) Imunocitoquímica de cultura primária de células neurais inoculadas com meio de cultivo NBA estéril incubadas com anticorpo policlonal anti-VROC. (200x).	42
Figura 9. Título viral do VROC em meio de cultivo de células neurais primárias infectadas, de acordo com o período infeccioso.....	43

Figura 10. Padrão de expressão gênica do INF- α nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.	45
Figura 11. Padrão de expressão gênica do INF- β nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.	46
Figura 12. Padrão de expressão gênica do INF- γ nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.	47
Figura 13. Padrão de expressão gênica da IL-1 β nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.	48
Figura 14. Padrão de expressão gênica do TNF- α nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.	49
Figura 15. Padrão de expressão gênica do TGF- β nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Soro de cabra
CCR5	Receptor de quimiocina 5
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CMC	Carboximetilcelulose
DAB	Diaminobenzidina
DBCA	Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Iba	Molécula ionizada adaptadora de ligação ao Cálcio
IC	Intracerebral
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
IRF	Fator Regulador de Interferon
KO	<i>Knockout</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LD	Dose letal
LPS	Lipopolissacarídeo

MCA	Citocina de Camundongo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófago
MOI	Multiplicidade de Infecção
NB3	Nível de Biossegurança 3
NBA3	Nível de Biossegurança Animal 3
NK	<i>Natural Killer</i>
NS	Proteína Não-Estrutural
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFU	Unidades Formadoras de Placa
p.i.	Pós-infecção
RIG-1	Receptor de ácido retinóico gene 1 induzível
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS	Proteínas supressoras de citocinas
TA	Temperatura Ambiente
TGF	Fator de crescimento transformante
Th	<i>T helper</i>
TLR	Receptor semelhante a Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VBSQ	Vírus Bussuquara
VCHIK	Vírus Chikungunya
VCPC	Vírus Capipacoré

VDEN	Vírus Dengue
VEJ	Vírus da Encefalite Japonesa
VESL	Vírus da Encefalite de Saint-Louis
VFA	Vírus da Febre Amarela
VIGU	Vírus Iguapé
VILH	Vírus Ilhéus
VMAY	Vírus Mayaro
VNJJ	Vírus Naranjal
VNO	Vírus do Nilo Ocidental
VORO	Vírus Oropouche
VPOW	Vírus Powassan
VROC	Vírus Rocio
VTBE	Vírus da Encefalite por Carrapatos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	ARBOVÍRUS.....	1
1.2	FLAVIVÍRUS.....	6
1.2.1	Flavivírus encefalitogênicos	10
1.3	VÍRUS ROCIO	13
1.4	IMUNOPATOLOGIA DAS ENCEFALITES CAUSADAS POR FLAVIVÍRUS.....	17
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	GERAL	25
3.2	ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	26
4.2	AMOSTRAS E ESTOQUE VIRAL	26
4.3	PRODUÇÃO DE SOROS HOMÓLOGOS	27
4.4	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	27
4.5	TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL.....	28
4.6	CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS.....	29
4.7	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS POR IMUNOCITOQUÍMICA	30
4.8	INFECÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS.....	31
4.9	DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS DO VROC POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	31
4.10	QUANTIFICAÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DO VROC NAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS NEURAIS INFECTADAS	32
4.11	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	33
4.12	DETECÇÃO DE CITOCINAS POR RT-QPCR EM TEMPO REAL	33

4.13	ANALISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	37
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL	37
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIIS	39
5.3	CINÉTICA DE MORTE DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIIS INFECTADAS COM O VROC.....	40
5.4	QUANTIFICAÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DO VROC NAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS NEURAIIS INFECTADAS EM FUNÇÃO DO PERÍODO INFECCIOSO	43
5.5	PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS	44
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	60
8	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO 1	74
	ANEXO 2	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVÍRUS

Arbovírus (arthropod-borne vírus) é um grupo ecologicamente bem definido de vírus zoonóticos que são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes hematófagos (em sua maioria mosquitos, flebotomíneos e carrapatos) e hospedeiros vertebrados (geralmente mamíferos e aves). Os arbovírus se multiplicam nos tecidos dos vetores artrópodes e são transmitidos aos hospedeiros vertebrados susceptíveis pela picada do inseto, após um período de incubação extrínseca. A partir disso, tais microrganismos se replicam e produzem viremia nos hospedeiros. O ciclo se fecha quando novos artrópodes se alimentam do sangue de animais previamente infectados. Ocorre também a transmissão entre os vetores, que se dá através da via transovariana e, possivelmente, da via sexual. Ressalta-se que somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas, ou seja, elas transmitem os arbovírus para humanos e outros vertebrados (Travassos da Rosa et al., 1998; Figueiredo, 2000; Azevedo et al., 2007; Vasconcelos et al., 2013).

Os arbovírus compõem o maior grupo conhecido de vírus tendo, desde 1992, aproximadamente 537 membros registrados no Catálogo Internacional dos Arbovírus (Karabatsos, 1985). Esta estimativa está crescendo continuamente em virtude dos avanços em técnicas de isolamento viral e sequenciamento gênico. Porém, embora muitos arbovírus não aparentem causar eventos patológicos em humanos ou animais, esse grande número de vírus amplamente diferentes e altamente adaptáveis fornece uma fonte imensa para emergência de novos patógenos (Liang et al., 2015). Hoje, em torno de 100 arbovírus são conhecidos por infectar seres humanos, 40 por infectar animais domésticos e pouco mais de 20 têm sido designados como causadores de doenças epidêmicas (Fauquet et al., 2005).

Os arbovírus representam um grave problema de saúde pública em todos os continentes, exceto Antártica, onde são responsáveis por endemias e epidemias que acarretam sérios prejuízos à saúde humana e veterinária, além de impactos sociais e econômicos. Nas Américas, ocorrem diversos agentes responsáveis por doenças tropicais negligenciadas consideradas fortes desafios e para o futuro previsível, dentre eles: vírus da Febre Amarela (VFA), vírus Dengue (VDEN), vírus Oropouche (VORO), vírus Mayaro (VMAY), vírus do Nilo Ocidental (VNO), vírus da Encefalite de Saint-Louis (VESL) e, mais recentemente, vírus Chikungunya (VCHIK) (Dye et al., 2013; Hotez et al., 2014).

O genoma dos arbovírus consiste em ácido ribonucleico (RNA), segmentado ou não, com uma ou duas fitas, com polaridade positiva, negativa ou *ambisense*. Excetua-se a essa regra o vírus da febre suína africana, que possui como material genético o ácido desoxiribonucleico (DNA), mas, comprovadamente, trata-se de um arbovírus (Karabatsos, 1985). Baseando-se nas suas propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus registrados está distribuída em cinco famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Bunyaviridae* (Fauquet et al., 2005). Acredita-se também na existência de possíveis arbovírus fazendo parte das famílias *Arenaviridae*, *Poxviridae*, *Hesperviridae*, *Coronaviridae*, entre outras. Contudo, devido suas características físico-químicas ainda não ser suficientemente conhecidas, muitos arbovírus não tem taxonomia definida (Travassos da Rosa et al., 1989).

A infecção humana por arbovírus ocorre acidentalmente, sendo maior o risco às pessoas que mantêm contato mais estreito com ambientes silvestres, onde se situam os nichos ecológicos desses agentes. No entanto, destaca-se que certas arboviroses têm surgido periodicamente em áreas urbanas, ocasionando epidemias e mesmo persistindo endemicamente, como é o caso da Dengue (Azevedo et al., 2007). Os arbovírus tem uma enorme gama de vetores vastamente distribuídos capazes de disseminá-los em larga escala e garantir sua sobrevivência. Aproximadamente 300 tipos de mosquitos, principalmente dos gêneros *Aedes* e *Culex*, e 116 diferentes espécies de carrapatos estão associados com a transmissão de arbovírus (Adelma et al., 2013). Além disso, sabe-se que mudanças ecológicas provocadas pelo ser humano, tais como o desmatamento desenfreado, a exploração do subsolo, a construção de hidrelétricas, a colonização humana e a urbanização não planejada, afetam a prevalência dos vetores, criam novos hospedeiros e induzem a emergência e reemergência dos arbovírus, levando-os a adaptarem-se a novos ciclos, muitas vezes integrados por animais migratórios. Com isso, uma vez capazes de trafegar em grandes distâncias, isto é, mover-se entre países ou mesmo continentes, os arbovírus incidem como potenciais causadores de pandemias (Figueiredo, 2007; Liang et al., 2015).

No Brasil, já foram isolados mais de 210 tipos de arbovírus, espalhados em várias regiões do território nacional. O fato deste ser um país de grande extensão territorial, circunscrito predominantemente nos trópicos, com vastas áreas de florestas tropicais e outros ecossistemas naturais e uma ampla biodiversidade tanta na fauna quanto na flora, significa que ele fornece as condições ideais para a ocorrência de zoonoses causadas por arbovírus. No país que possui cerca de 200 milhões de habitantes, a maioria deles vivendo em áreas urbanas

densamente infestadas por mosquitos vetores dos gêneros *Aedes* e *Culex*, serve de alerta que a constante chegada de pacientes virêmicos infectados em áreas silvestres aumenta consideravelmente os riscos de ocorrência de surtos de infecção em áreas urbanas densamente habitadas (Figueiredo, 2000; Figueiredo, 2007).

Estudos realizados na Amazônia brasileira entre 1954 e 2003 por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas revelaram a caracterização de cerca de 11.000 isolamentos, bem como a existência de pelo menos 195 sorotipos diferentes de arbovírus, 90 dos quais novos para a ciência e 34 efetivamente responsáveis por doenças em humanos, como febre, febre exantemática, doença hemorrágica e encefalite (Azevedo et al., 2007). Na região Amazônica, a maior parte dos arbovírus são os que possuem características patogênicas indeterminadas para o ser humano e, por isso, é difícil avaliar a capacidade destes agentes de se tornarem causadores de enfermidades. Os agentes até então encontrados na Amazônia são distribuídos em 21 grupos sorológicos, contendo 162 tipos diferentes e mais 33 vírus que não são agrupados. Cerca de dois terços dos isolamentos obtidos na Amazônia ocorreram nela própria antes que o fossem em qualquer outra parte do mundo; muitos desses arbovírus jamais foram encontrados fora dessa região (Travassos da Rosa et al., 1998; Azevedo et al., 2007).

A natureza da doença produzida no ser humano (arbovirose) varia conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção. A maioria destes vírus provoca uma doença febril branda com evolução benigna, sem ocasionar óbito ou incapacidades. Algumas exceções estão associadas a doenças graves que atribuem danos severos e probabilidade de morte. É importante frisar que um mesmo tipo de arbovírus é capaz de causar diferentes alterações clínicas e, da mesma forma, a mesma sintomatologia pode ser determinada por diferentes arbovírus (Vasconcelos et al., 1992, 1998; Azevedo et al., 2007).

Os mecanismos de patogenicidade que dão origem às manifestações clínicas e às alterações patológicas provenientes da maioria das arboviroses ainda não estão completamente elucidados. Estudos experimentais demonstraram que os arbovírus se multiplicam, em primeiro lugar, nos tecidos próximos à área da pele picada pelo artrópode infectado, principalmente nas células de Langerhans, e em seguida, nos gânglios linfáticos regionais. A partir desse ponto, os vírus alcançam a corrente sanguínea através dos vasos linfáticos, disseminando-se pelos órgãos e tecidos do hospedeiro. Os arbovírus se multiplicam nesses locais e são lançados novamente na corrente sanguínea, onde infectam células da linhagem monocítica, determinando a viremia que corresponde ao período febril. Na maioria dos casos, a infecção não progride e o indivíduo se recupera totalmente, sem sequelas.

Algumas vezes, porém, os vírus se disseminam por outros tecidos viscerais, incluindo o Sistema Nervoso Central (SNC) (quando atravessam a barreira hematoencefálica) (Figura 1), ocasionando processos inflamatórios e destruição tecidual, que dão origem às manifestações exantemáticas, hemorrágicas ou neurológicas das arboviroses (Araújo et al., 1979; Johnston et al., 2000; Azevedo et al., 2007).

O diagnóstico laboratorial específico para arboviroses pode ser realizado por quatro métodos distintos: isolamento viral, histopatologia, técnicas de biologia molecular e sorologia. O método ideal para a determinação do agente causador de uma infecção é o isolamento do vírus, cujo material biológico utilizado geralmente consiste em sangue total, soro, plasma, líquido cefalorraquidiano (LCR) e fragmentos de vísceras. Esses espécimes são usados para inoculações em hospedeiros suscetíveis (de praxe camundongos albinos *swiss* recém-nascidos), que tem seu cérebro e/ou fígado extraído na tentativa de isolar o vírus, ou cultivos celulares de origem animal (linhagens de células VERO, BHK-21 e LLC-MK2, AP61, clone C6/36, TRA 284, entre outras). Uma vez isolado, o vírus pode ser identificado através de testes de fixação do complemento, imunohistoquímica ou imunofluorescência (Travassos da Rosa et al., 1994).

Não existe tratamento específico para as arboviroses. Em indivíduos imunocompetentes, espera-se que o sistema imunológico se encarregue de eliminar o vírus do organismo infectado. Rotineiramente, procura-se conservar o estado geral da pessoa doente adotando-se medidas de suporte para manutenção das funções vitais. Recomenda-se repouso e algumas vezes hidratação, principalmente nos quadros febris hemorrágicos e encefalites, onde é nítido o agravamento dos casos que não seguem tal indicação (Vasconcelos et al., 1992, 1998). Como medidas preventivas, dispõem-se os cuidados individuais como vacinação e controle vetorial. Atualmente, existem vacinas disponíveis para o vírus da Febre Amarela (VFA), vírus da Encefalite por Carrapatos (VTBE) e vírus da Encefalite Japonesa (VEJ) (Flipse & Smit, 2015). No Brasil, tem destaque a vacina para o VFA, que se mostra bastante eficaz, segura e quase sem efeitos colaterais (Vasconcelos, 2003). Uma vacina contra a dengue pode se converter, no futuro, em uma ferramenta importante para prevenir a infecção ou abortar epidemias. Atualmente, vacinas vivas atenuadas contra os sorotipos do VDEN estão sendo testadas em fases clínicas e pré-clínicas, e tem-se trabalhado ainda no desenvolvimento de uma vacina desenhada geneticamente (Wan et al., 2013).

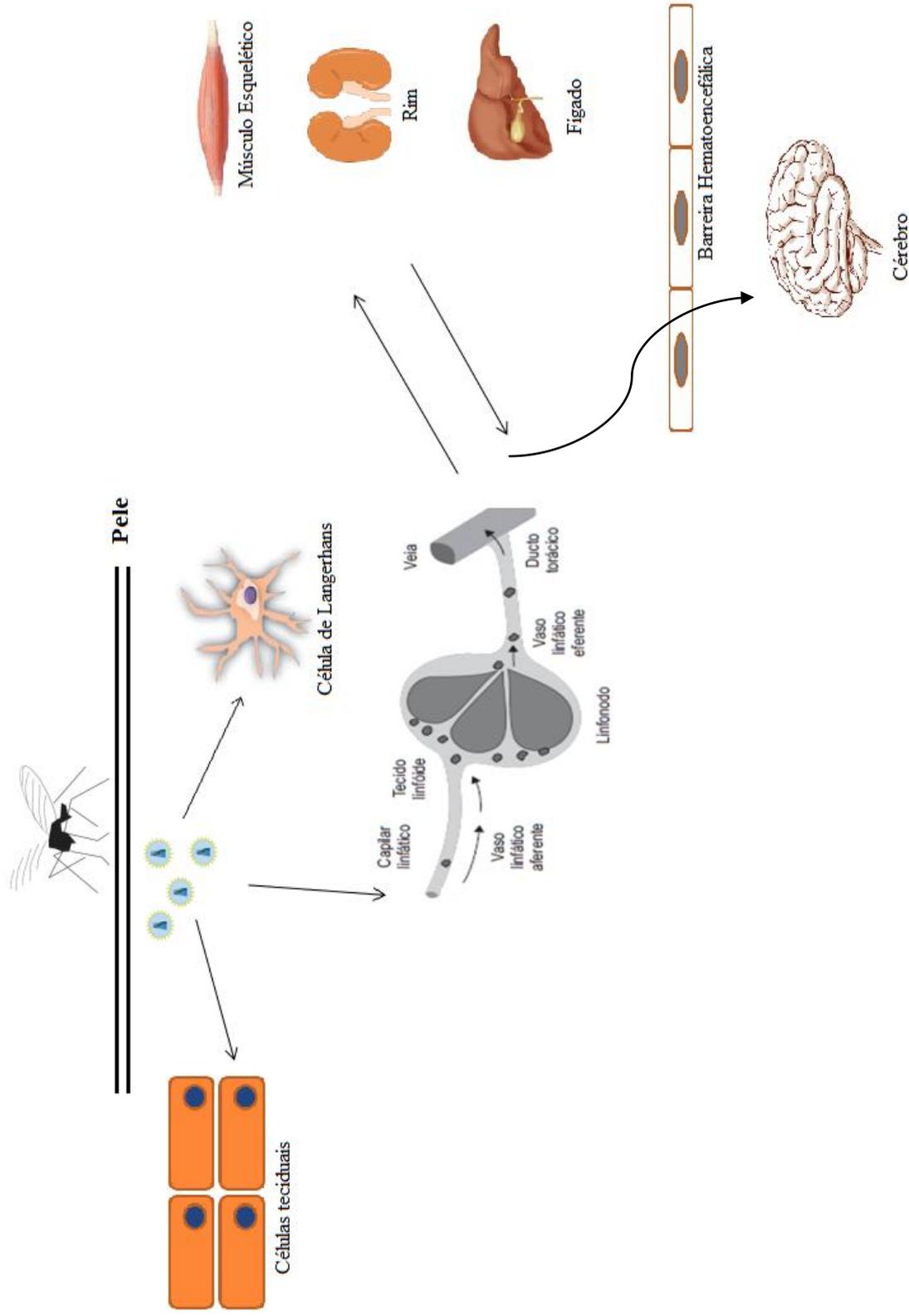


Figura 1. Mecanismos de patogenicidade dos arbovírus. Os arbovírus penetram no organismo hospedeiro através da picada do vetor e se replicam nas células teciduais e gânglios linfáticos próximos à área da picada. A seguir, alcançam a corrente sanguínea e se replicam nos órgãos do hospedeiro. Depois são lançados novamente na corrente sanguínea e atingem outros órgãos, incluindo o SNC.
 Fonte: Turtle et al. (2012), com modificações.

1.2 FLAVIVÍRUS

Dentre os arbovírus, são importantes os vírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, que incluem cerca de 55 espécies de vírus de RNA de fita simples, os quais compartilham sequências de nucleotídeos, características antigênicas e características ecológicas (Karabatsos, 1985). São responsáveis por considerável morbi-mortalidade, podendo causar quadros graves de encefalite, febre hemorrágica, hepatite e doença febril em vertebrados, incluindo humanos (Monath et al., 1996; Saeedi & Geiss, 2013; Vasconcelos et al., 2013).

Existem 35 flavivírus conhecidos por causar doenças em humanos e estima-se que aproximadamente dois terços da população mundial estão expostos ao risco de infecção por um ou mais destes agentes. Dentre os principais flavivírus epidêmicos destacam-se o VDEN, que infecta cerca de 50 milhões de indivíduos por ano e é a principal causa de mortalidade infantil em vários países latinos e asiáticos; o VNO, que se tornou endêmico no Hemisfério Norte desde 1999 e permanece causando problemas significativos em saúde pública; o VFA, que é endêmico em países da África e América do Sul e causa mais de 30 mil mortes na África mesmo com a distribuição da vacina; e o VEJ, endêmico em países asiáticos, sendo responsável por 30% a 40% da taxa de mortalidade (ECDC, 2012; Saeedi & Geiss, 2013).

No Brasil, doze flavivírus já foram isolados: Bussuquara (VBSQ), Cacipacoré (VCPC), Dengue (VDEN) 1, 2, 3 e 4, Iguape (VIGU), Ilhéus (VILH), Naranjal (VNJL), Rocio (VROC), Encefalite de Saint-Louis (VESL) e Febre Amarela (VFA) (Travassos da Rosa et al., 1998; Figueiredo, 2000). Romano-Lieber & Iversson (2000) observaram uma intensa circulação de flavivírus no Vale do Ribeira/SP a partir de levantamentos sorológicos realizados durante a década de 90. Notificou-se uma prevalência de anticorpos contra flavivírus de 12,6%, sendo 2,2% para VILH, 7,1% para VESL e 3,3% para VROC. Também, Figueiredo et al. (1986) constataram uma prevalência de 7,3% de anticorpos contra flavivírus em uma população na região de Ribeirão Preto/SP, sendo 2,6% desses anticorpos anti-VESL e um caso apresentando anticorpos neutralizantes contra o VROC. Rodrigues et al. (2010a), investigando a imunidade de equinos em relação ao VESL em 5 cidades distintas (quatro da região amazônica e uma do Estado de Mato Grosso do Sul), observaram uma prevalência de 44,8% de anticorpos contra flavivírus – 27,1% de reatividade cruzada, 9,8% anti-VESL, 4,6% anti-VILH, 2,1% anti-VROC, 1,1% anti-VCPC e 0,1% anti-VBSQ, sugerindo uma circulação generalizada desses vírus no país.

Em um estudo de vigilância epidemiológica para arbovírus realizado no município de Juruti (PA), Cruz et al. (2009) identificaram, a partir de soros de humanos, uma prevalência de 56,48% de anticorpos neutralizantes para vírus da família *Flaviviridae* e 20,12% de reatividade cruzada para vírus das famílias *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Togaviridae*. Também, reações monotípicas foram observadas para os flavivírus Dengue 1, 2 e 3, Febre Amarela, Ilhéus e Encefalite de Saint-Louis. 8,2% dos soros e plasmas de animais silvestres estudados apresentaram anticorpos para os flavivírus Cacipacoré, Encefalite de Saint-Louis, Febre Amarela, Ilhéus e Rocio. Estes achados evidenciaram a predominância da circulação de Flavivírus na área de estudo e insinuam a intensa circulação desses vírus na região amazônica. Ainda, Casseb et al. (2014) avaliaram a prevalência de anticorpos contra seis importantes flavivírus em búfalos provenientes do Estado do Pará. Observaram prevalências de 22,48% anti-VESL, 11,16% anti-VILH, 3,51% anti-VFA, 1,99% anti-VROC, 0,92% anti-VBSQ e 1,22% anti-VCPC. Estes resultados evidenciam uma infecção ativa de búfalos da região amazônica por flavivírus e alertam para o risco de saúde aos humanos que podem ser susceptíveis a desenvolver infecção.

Os flavivírus são envelopados esféricos, com projeções na superfície e partículas virais medindo cerca de 60nm de diâmetro. O capsídeo possui simetria icosaédrica, sendo constituído por uma única proteína estrutural (C), e o envelope por duas proteínas estruturais (E e M) (figura 2). Seu genoma contém aproximadamente 11.000 nucleotídeos e é composto por uma curta região não-codificante 5', uma única fase de leitura aberta contendo mais de 10.000 nucleotídeos e um terminal não-codificante 3'. A longa fase de leitura aberta codifica as proteínas estruturais - capsídeo (C), pré-membrana (prM) e Envelope (E) - e 7 proteínas não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A proteína prM é clivada em proteína M pela ação de uma protease celular (furin) e, então, a proteína M é incorporada ao virion maduro (Chambers et al., 1990; Petersen & Roehrig, 2001) (figura 3).

A proteína E corresponde à hemaglutinina viral, isto é, ela reconhece uma variedade de estruturas moleculares e orquestra a ligação e entrada dos vírus nas células alvo, sendo também o principal alvo para anticorpos neutralizantes, e a proteína M está associada ao processo de maturação viral. As proteínas não estruturais são necessárias durante a replicação viral e possuem atividade de protease serina (NS2B e NS3), RNA-helicase (NS3), e RNA polimerase dependente de RNA (NS5). O papel da NS1 não é completamente conhecido, porém já se demonstrou que induz resposta imune específica, constituindo um antígeno fixador de complemento e sendo encontrada no interior de células infectadas bem como na

superfície celular e no meio extracelular. A NS2B, além de estar associada com atividade de protease, age como co-fator da NS3. A NS4A e NS4B participam da síntese do RNA viral. NS5 é a proteína maior e mais altamente conservada dos flavivírus (Lindenbach & Rice, 2003; Fauquet et al., 2005; Dowd & Pierson, 2011).

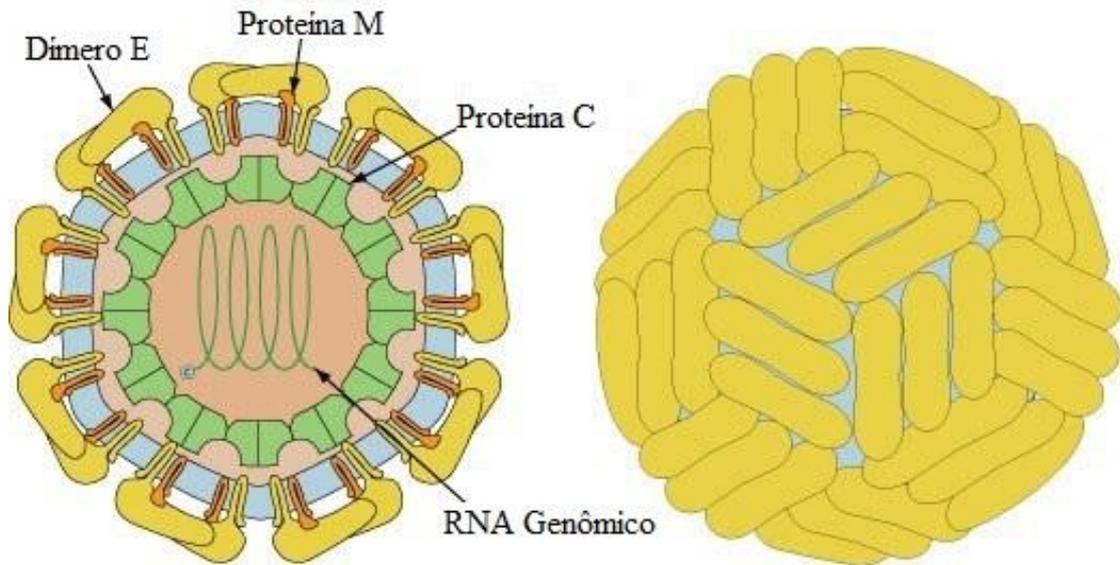


Figura 2. Esquema da estrutura dos flavivírus.
Fonte: <http://viralzone.expasy.org>

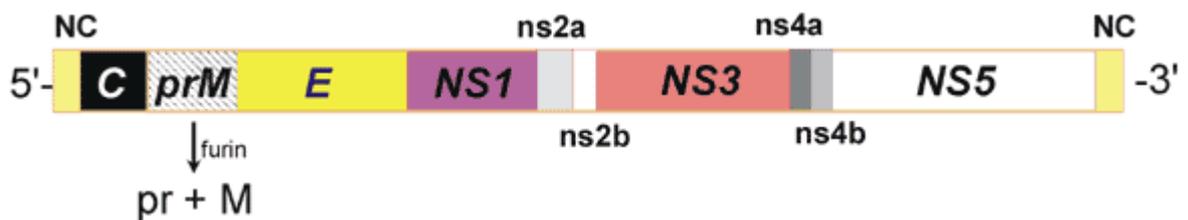


Figura 3. Esquema da organização do genoma dos flavivírus.
Fonte: Petersen & Roehrig, 2001.

O ciclo de replicação dos flavivírus inicia-se com a entrada das partículas virais na célula hospedeira por endocitose e a liberação do núcleo-capsídeo via fusão de membranas. O genoma viral é transportado para o retículo endoplasmático rugoso, onde as poliproteínas são traduzidas e clivadas em proteínas virais maduras. As proteínas da replicação induzem reconformações de membrana que geram compartimentos membranosos onde a replicação do RNA ocorre. O RNA genômico de polaridade positiva é usado como molde para a produção de baixos níveis de RNA de polaridade negativa não complementar, que é usado como molde para produção de altos níveis de RNA genômico complementar de polaridade positiva. Uma proporção de fitas de RNA recém-sintetizadas é usada para tradução de proteínas e reforço da síntese viral, enquanto algumas fitas interagem com o RNA de interferência (RNAi), e outras ainda interagem com proteínas do capsídeo, sendo armazenadas nos vírions nascentes. Vírions imaturos são levados para o sistema de membrana excretório da célula hospedeira, seguindo para a superfície celular onde ocorre a exocitose. Após a exocitose a proteína prM é clivada pela protease furin, formando as partículas virais maduras contendo a proteína M (Lindenback & Rice, 2003; Smit et al., 2011).

Os flavivírus são divididos, na sua maioria, de acordo com os seus determinantes antigênicos em quatro grupos sorológicos principais: Dengue (DEN), Complexo da encefalite por carrapatos (TBEC), Complexo da Encefalite Japonesa (JEC) e Febre Amarela (YF) (Fauquet et al., 2005). Também, estudos filogenéticos baseados no sequenciamento da terminação 3' do gene NS5 de flavivírus brasileiros agrupam-nos em três ramos principais: o ramo Dengue, com subdivisão nos tipos VDEN 1, 2, 3 e 4; o ramo do Complexo do Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), incluindo os vírus: VESL, VCPC, VBSQ, VROC, VILH, VNJL e VIGU; e o ramo do vírus da Febre Amarela (VFA) (Kuno et al., 1998; Baleotti et al., 2003; Medeiros et al., 2007; Coimbra et al., 2008).

É interessante notar que vírus transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, como VDEN e VFA, que são também os únicos causadores de doença hemorrágica no Brasil, foram agrupados em mesmos ramos. Da mesma forma, vírus transmitidos por mosquitos do gênero *Culex* e causadores de doença encefálica, como VROC e VESL, foram agrupados no ramo do complexo do VEJ, que é um vírus altamente encefalitogênico. Essa divisão faz surgir a hipótese que vírus intimamente relacionados possuem as mesmas características no que se refere a interações vírus-hospedeiro, patogenicidade e ocorrência de doença (Baleotti et al., 2003).

1.2.1 Flavivírus Encefalitogênicos

Encefalite é uma inflamação do SNC causada por infecção, geralmente de origem viral. Atualmente, dez arbovírus têm sido associados com quadros de doença encefalitogênica no continente americano. Desses, quatro pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*: vírus da Encefalite de Saint-Louis (VESL), vírus do Nilo Ocidental (VNO), vírus Powassan (VPOW) e vírus Rocio (VROC) (Vasconcelos et al., 1991, 2013). Estes agentes apresentam como característica um especial tropismo por células SNC, afetando-o em diferentes níveis de severidade. Ao infectarem humanos e outros vertebrados, esses vírus produzem viremia e atingem o encéfalo, onde se replicam e recrutam células inflamatórias, causando doença febril aguda e distúrbios do SNC. Os sinais e sintomas clínicos deste tipo de infecção incluem: febre, dores de cabeça, náusea, vômito, calafrios, tremores, dor abdominal, mialgia, artralgia, icterícia, alterações do estado de consciência, convulsões, distúrbios de reflexo, deterioração de funções motoras, irritação da meninge e síndrome cerebelar (Pinheiro et al., 1981; Vasconcelos et al., 1991; Burke e Monath, 2001; Barros et al., 2011; Henriques et al., 2012; Vasconcelos et al., 2013).

O VESL está amplamente distribuído nas Américas, podendo ser encontrado do Canadá à Argentina. Foi isolado pela primeira vez em 1933, na cidade de Saint Louis, Estados Unidos da América, a partir de tecido cerebral humano (Vasconcelos et al., 1998). No Brasil, a primeira cepa encontrada deste vírus foi isolada em 1960, de um criadouro de mosquitos da espécie *Sabethes belisarioi* capturado ao longo da rodovia Belém-Brasília, estado do Pará (Causey et al., 1964). Estudos relacionados ao ciclo de transmissão do VESL na região amazônica revelaram que os vetores deste vírus são os mosquitos do gênero *Culex* e os seus reservatórios consistem de aves selvagens, macacos, preguiças, tatus e marsupiais (Travassos das Rosa et al., 1998).

Na década de 70, foi observado um caso isolado de infecção sintomática pelo VESL na cidade de Belém, Estado do Pará, o qual, embora não representasse a ocorrência de epidemia, indicou a presença do agente na região amazônica brasileira (Pinheiro et al., 1981). Também, Rodrigues et al. (2010a) constataram alta prevalência de anticorpos anti-VESL (50,9%) em cavalos saudáveis da região amazônica, sendo observada uma elevada frequência de anticorpos no Macapá/AP (60,9%), Bragança/PA (59,4%), Rio Branco/AC (53,4%) e Salvaterra/PA (34,6%). Em geral, o VESL não causa doença com sinais clínicos aparentes em equinos, o que explica a alta prevalência de anticorpos anti-VESL, apesar de haver subnotificação dos casos de infecção por esse agente.

Estudos filogenéticos comparativos demonstraram que o VESL é um flavivírus relativamente novo no continente americano em relação a outros arbovírus mais predominantes, tais como dengue e febre amarela, tendo uma história evolutiva datada entre 1875 e 1973. Além disso, acredita-se que a dispersão deste agente tenha começado na América do Sul em direção à América do Norte, de modo que a introdução de um determinado progenitor (ancestral de genótipo comum) e a ocorrência de eventos evolucionários - quase que simultâneos nos dois hemisférios - levaram à emergência e dispersão geográfica de linhagens filogenéticas distintas em ambas as localidades. De fato, já foram identificados oito genótipos diferentes para VESL, designados como I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, sendo os genótipos V e VIII os mais prevalentes no Brasil e, ainda, o VIII restrito ao Estado do Pará (Rodrigues et al., 2010b).

O isolamento do VESL em seres humanos é raro, apesar de já ter sido detectado em aves e mamíferos de diversas regiões do Brasil. Geralmente, as infecções são notificadas somente em períodos de epidemias, que ocorrem tipicamente nos meses de verão quando as populações de vetores estão maiores. Nos últimos anos, um surto de infecção pelo VESL ocorreu concomitante a uma grande epidemia de dengue na cidade de São José do Rio Preto/SP. Contudo, a falta de pesquisa diagnóstica sistemática e também a similaridade entre os sintomas da infecção por VESL com os do dengue fazem com que casos não sejam adequadamente diagnosticados (Mondini et al., 2007). Além disso, o baixo número de casos notificados de infecção por VESL em humanos, provavelmente, se deva à ocorrência de infecções sem sinais e sintomas aparentes ou à subdetecção dos casos clínicos devido à dificuldade de realização de diagnóstico diferencial, uma vez que os testes sorológicos tendem a apresentar altas taxas de reatividade cruzada (Rodrigues et al., 2010a).

O VNO foi originalmente descoberto na África, em 1937 (Smithburn et al., 1940). Historicamente, foi responsável por diversos surtos de forte doença febril em regiões da África, Oriente Médio, Ásia e Austrália (Kleiboeker, 2011). Na década de 90, a epidemiologia da infecção pelo VNO mudou. Novos surtos na Europa Oriental foram associados com índices mais altos de severa doença neurológica (Hubálek & Halouzka, 1999). O VNO foi isolado pela primeira vez no Ocidente em 1999, na cidade de Nova York, EUA (Asnis et al., 2000). Hoje, o VNO pode ser encontrado praticamente em qualquer lugar do Hemisfério Norte, tendo sido responsável por severas epidemias de encefalite em humanos, aves e equinos, com alguns milhares de óbitos (Petersen & Hayes, 2008). O ciclo natural desse vírus envolve mosquitos do gênero *Culex* e aves reservatórias, que se comportam como hospedeiros

amplificadores. Humanos e outros vertebrados têm sido amplamente considerados como hospedeiros terminais (Hayes et al., 2005). As aves reservatórias do VNO são tipicamente animais migratórios que, quando infectados, carregam-no internacionalmente. Acredita-se que este seja o motivo da rápida dispersão deste vírus na América do Norte (Smith et al., 2005).

Análises filogenéticas tem demonstrado que o VNO é um vírus genética e geograficamente bem diversificado. Quatro ou cinco linhagens genéticas distintas já foram propostas para o VNO, baseando-se em estudos isolados que demonstraram diferenças entre os genomas virais de mais de 20% e forte correlação com o ponto geográfico de isolamento. As linhagens 1, 2 e 5 têm sido associadas a surtos significativos em seres humanos, sendo a linhagem 1 a mais amplamente distribuída no mundo (Chancey et al., 2015). A maioria das infecções em seres humanos pelo VNO (~ 80%) é assintomática, e as infecções sintomáticas podem variar de um simples mal-estar gripal até uma doença neuroinvasiva grave. Menos de 1% das infecções humanas progridem para doença grave, estando entre os fatores de risco mais frequentemente associados: idade avançada, imunodepressão, e condições médicas crônico-degenerativas, como hipertensão, diabetes, e insuficiência renal crônica (Bode et al., 2006; Jean et al., 2007; Carson et al., 2012).

A primeira detecção do VNO na América do Sul foi em 2004, na Colômbia, durante uma pesquisa epidemiológica em cavalos não vacinados contra o VNO (Mattar et al., 2005). Depois, o VNO foi isolado em 2006, na Argentina, a partir do cérebro de três cavalos que morreram de doença encefálica (Morales et al., 2006). Igualmente em 2006, o VNO foi detectado em aves e cavalos na Venezuela, em um estudo soropidemiológico (Bosch et al., 2007). No Brasil, o VNO foi detectado a partir de amostras coletadas, em 2009, de mosquitos, cavalos, galinhas e jacarés do Pantanal na região Centro-Oeste do Brasil, onde cavalos e galinhas apresentaram sorologia positiva para VNO (Ometto et al., 2013; Pauvolid-Corrêa et al., 2011, 2014). Soropositividade para o VNO também foi observada em uma amostra de equino coletada em 2009 no Estado da Paraíba (Silva et al., 2013).

Não há registros de isolamento do VNO associado a doenças em humanos ou equinos no Brasil (Soares et al., 2010). Contudo, uma vez introduzido no país, é muito provável que este vírus se espalhe por todo o território brasileiro, devido ao seu ciclo de transmissão e a constante chegada de aves migratórias advindas do Hemisfério Norte. Além disso, imagina-se que a ausência de relatos de doença associada ao VNO em humanos esteja relacionada à proteção imune cruzada da população brasileira, que está em constante contato com outros flavivírus, à proteção imune cruzada de pássaros nativos previamente infectados

por outros flavivírus, ou mesmo pela falta de um vetor que se alimente do sangue de animais infectados e de humanos (Figueiredo, 2007; Figueiredo MLG & Figueiredo LTM, 2014).

1.3 VÍRUS ROCIO

O vírus Rocio foi primeiramente isolado em 1975 a partir de um caso fatal em humanos ocorrido durante um surto de encefalite no Vale do Ribeira no Estado de São Paulo (Lopes et al., 1978; Pinheiro et al., 1997). Este surto começou em 1973 e terminou em 1980, intervalo em que foram notificados 1021 casos de encefalite com uma taxa de letalidade de 10%. Entre os sobreviventes, 200 desenvolveram sequelas de equilíbrio ou motilidade. Antes da epidemia os casos de encefalite por vírus na região eram raros, sendo registrados de 1970 a 1973 somente cinco óbitos por encefalite viral, enquanto que nos anos epidêmicos de 1976 a 1977 ocorreram 47 óbitos (Iversson, 1980). A doença causada pelo VROC caracterizou-se por início abrupto com febre elevada, cefaléia, prostração, mialgias e vômito. O quadro neurológico se manifestou apresentando alterações de consciência, alterações motoras e de reflexo, distúrbios de equilíbrio e mobilidade, e convulsões (Iversson & Tiriba, 1996).

Com base em isolamentos virais e dados sorológicos realizados durante este surto, acredita-se que o VROC mantém-se em um ciclo envolvendo pássaros silvestres - incluindo algumas espécies migratórias - e mosquitos vetores dos gêneros *Aedes* e *Psorophora* (Lopes et al., 1981; Mitchell et al., 1986). Sabe-se que a epidemia de VROC mostrou picos de infecção em períodos de temperaturas mais elevadas e de maior pluviosidade na região, coincidindo com o período de maior proliferação do vetor. Neste caso, a epidemia se deslocou em onda a partir de Iguape para Peruíbe e, a partir daí, em direção leste-oeste e leste-sudeste, rumo ao Estado do Paraná. Além da transmissão por vetores artrópodes, outras possíveis formas de transmissão da doença teriam sido aerossóis ou manipulação de animais silvestres infectados. Os grupos populacionais que tiveram as formas mais graves da doença foram os de idade avançada ou que apresentavam piores condições de vida. Uma maior quantidade de anticorpos anti-VROC foi encontrada em indivíduos que mantinham contato com ambientes silvestres (Iversson, 1980).

Até o presente momento, o VROC foi isolado apenas no Vale do Ribeira durante o período do surto de encefalite. Este surto começou e desapareceu espontaneamente, sendo desconhecidos os seus determinantes, o que torna a epidemiologia do VROC praticamente desconhecida. Evidências sorológicas da circulação do VROC foram constatadas no Vale do

Ribeira e em outras partes do Estado de São Paulo, como no município de Ribeirão Preto, bem como em outras localidades do Brasil, o que indica dispersão do agente pelo país, especialmente em áreas rurais situadas nas regiões Nordeste e Sudeste (Iversson et al., 1989; Iversson et al., 1992; Romano-Lieber & Iversson, 2000; Figueiredo, 2007). Durante o período de 1978 a 1990, anticorpos anti-VROC foram encontrados em aves de distintas regiões do Estado de São Paulo (Ferreira et al., 1994). Também, em quatro cidades do Estado da Bahia foram observados oito casos de positividade para anticorpos anti-VROC a partir de um inquérito soro-epidemiológico para arboviroses em humanos (Straatmann et al., 1997), e na região amazônica, foram detectados anticorpos anti-VROC em cavalos saudáveis (Rodrigues et al., 2010a).

Alguns estudos brasileiros foram desenvolvidos com o intuito de caracterizar e melhor entender os mecanismos de infecção e invasão do SNC pelo VROC. Medeiros et al. (2007) realizaram a caracterização genômica completa do VROC bem como a determinação das suas exatas relações taxonômicas e filogenéticas com outros flavivírus relacionados, fornecendo dados fundamentais para estudos futuros de classificação viral acurada, escolha de genes informativos que conduzam análises filogenéticas e projeção de sondas moleculares e de iniciadores. Neste estudo, constatou-se que o VROC compartilha muitos traços genéticos com outros arbovírus da família *Flaviviridae* e apresenta estruturas peptídicas conservadas, tais como o padrão de distribuição de resíduos de cisteína nas proteínas prM, E e NS1.

Considerando-se a permissividade de monócitos circulantes e macrófagos teciduais aos flavivírus, após a inoculação pelo vetor, e a participação dessas células na replicação viral e na modulação da resposta imune antiviral pela produção de citocinas e óxido nítrico (Kreil & Eibl, 1995), Barros et al. (2009) realizaram um estudo *in vitro* com macrófagos murinos infectados pelo VESL, VROC e outros flavivírus. Observou-se que nenhum vírus alterou significativamente a expressão de Interleucina 1 beta (IL-1 β), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) em macrófagos infectados. Mas, a infecção de macrófagos estimulados por Lipopolissacarídeo (LPS) gerou alterações significativas. O VESL reduziu a produção de IL-1 α e TGF- β por macrófagos LPS-estimulados, enquanto o VROC reduziu apenas a síntese de TGF- β pelas mesmas células. Além disso, enquanto o VESL e o VROC estimularam a produção de Interferon gama (INF- γ), nenhum deles alterou a produção de TNF- α pelos macrófagos. Ambos os vírus, VESL e VROC, induziram a síntese de óxido nítrico, que é um radical livre com efeito microbicida.

Barros et al. (2011) realizaram um amplo estudo sobre imunopatogênese e

fisiopatologia da meningoencefalite por VROC em ratos infectados intraperitonealmente, analisando aspectos da histopatologia tais como resposta inflamatória, produção de citocinas e pesquisa do vírus em tecido nervoso. Observaram uma quantidade significativa de infiltrado inflamatório e antígenos virais em neurônios, células gliais, endotélio e células mononucleares da medula raquidiana a partir do quarto dia pós-infecção (p.i.) e do cérebro a partir do oitavo dia p.i.. Houve, ainda, uma expressão significativamente aumentada de INF- α , em menos de 24 horas p.i. na medula raquidiana e a partir do quarto dia p.i. no cérebro. INF- γ e IL-1 β foram detectados a partir de dois dias p.i., TNF- α , IL-4 e TGF- β foram detectados a partir de quatro dias p.i. e IL-10 foi detectada apenas a partir do sexto dia p.i.. Estes achados sugerem que a infecção pelo VROC, e provavelmente outros flavivírus encefalitogênicos, induz um balanço na expressão de citocinas do tipo *T helper* (Th) 1 e 2, cujo objetivo é realizar uma resposta imune adequada. Porém, mesmo a combinação de respostas imune dos tipos Th1 e Th2 não foi capaz de controlar a infecção pelo VROC, de modo que todos os animais infectados adoeceram a partir do sexto dia p.i. e morreram até o nono dia p.i..

Estudos experimentais evidenciaram que infecções por flavivírus, não raramente, desenvolvem um quadro de infecção persistente no organismo dos hospedeiros, sendo constantemente replicados e excretados pelo organismo infectado. Este fato se deve, entre outras coisas, à habilidade destes vírus de reduzir a resposta imune antiviral do hospedeiro e, assim, inibir a destruição das células infectadas (Oldstone, 2006). Henriques et al. (2012) demonstraram que hamsters jovens imunocompetentes infectados pelo VROC desenvolvem viremia, detectada por imunofluorescência indireta (IFI) em cultura de células VERO, por até no máximo 4 dias p.i., e anticorpos neutralizantes são detectados no soro destes animais a partir do quinto dia p.i., coincidindo com o desaparecimento do vírus do sangue. Contudo, a detecção do genoma viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em amostras de sangue, fígado, cérebro e urina revelou a persistência da infecção pelo VROC em um período de quatro meses desse estudo experimental. Além disso, foram observadas alterações histopatológicas no fígado, rim, pulmão e cérebro com processos inflamatórios em vários tecidos, sobretudo no SNC, durante os mesmos quatro meses analisados, corroborando como perfil de infecção persistente por VROC.

Chavez et al. (2013) avaliaram o papel da quimiocina proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1 α), relacionada ao recrutamento de células inflamatórias, e seu receptor (CCR5) na infecção pelo VROC em camundongos. Realizou-se um estudo comparativo entre 3 grupos de camundongos: tipo selvagem (MIP-1 α +/+ e CCR5 +/+),

camundongos *knockout* (KO) MIP-1 $\alpha^{-/-}$ e camundongos *knockout* CCR5 $^{-/-}$, analisando-se aspectos de virulência, sobrevivência dos animais, carga viral no tecido cerebral e histopatologia. Observou-se que os camundongos tipo selvagem necessitaram de uma dose de letalidade de 6,5 (\log_{10}) LD₅₀ para induzir morte em 50% dos animais, enquanto que os camundongos KO MIP-1 $\alpha^{-/-}$ e CCR5 $^{-/-}$ necessitaram de doses de 4 e 5 (\log_{10}) LD₅₀, respectivamente. Os animais tipo selvagem começaram a apresentar sinais de encefalite a partir do 4º dia p.i., já os KO apresentam sinais tardios, depois de 21 dias p.i.. Interessantemente, os camundongos tipo selvagem apresentaram uma taxa de sobrevivência consideravelmente diminuída em relação aos *knockout*, os quais sobreviveram por mais de 21 dias pós-infecção ao passo que os tipo selvagem sobreviveram por no máximo 8 dias p.i.. O aumento da sobrevivência dos KO, provavelmente, está relacionado a menores infiltrados de células inflamatórias responsáveis por neurodegeneração observados no cérebro por histopatologia, resultado da deficiência de MIP-1 α e CCR5. Ao contrário do que se esperava, os camundongos KO tiveram uma carga viral, detectada em fração do cérebro, menor do que os tipo selvagem em 7 dias p.i.. Os autores defendem a hipótese de que o CCR5, tal qual em infecções pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pode representar um co-receptor para a infecção viral pelo VROC e a ausência deste mostra-se benéfica para os animais infectados pelo VROC. Assim, MIP-1 α e CCR5 estão diretamente associados ao mecanismo de infecção do VROC, pois participam do recrutamento de células inflamatórias no cérebro, o que contribui para a severidade da doença encefálica.

Rosemberg (1980) relatou aspectos neuropatológicos da infecção pelo VROC a partir de amostras cerebrais de cadáveres humanos acometidos da grave encefalite no Vale do Ribeira durante a década de 70. Macroscopicamente, observou-se um moderado grau de congestão e edema, sem lobo temporal conspícuo ou herniação do cerebelo. Microscopicamente, observaram-se alterações características de processo inflamatório tipicamente encontrado em encefalites virais, quais sejam: forte infiltrado intersticial de células mononucleares, proliferação microglial e acúmulo linfocítico perivascular.

1.4 IMUNOPATOLOGIA DAS ENCEFALITES CAUSADAS POR FLAVIVÍRUS

O SNC é considerado um sítio imunoprivilegiado, isto é, possui certo grau de proteção às respostas imunes e inflamatórias, as quais podem causar perturbação funcional e morte de neurônios com consequente disfunção orgânica. Esse imunoprivilégio se deve ao fato de o cérebro ser desprovido de drenagem linfática funcional, ter raras células imunocompetentes trafegando pelo seu parênquima e conter apenas cerca de 0,5% da quantidade total de anticorpos presentes no soro (Abbas et al., 2011). Em virtude disso, o SNC mostra-se altamente vulnerável à infecções virais. No entanto, a maioria das infecções virais sistêmicas não envolve o SNC. Isso se dá, provavelmente, pelo significativo grau de proteção física desse órgão à exposição viral mediado pela barreira hematoencefálica e também pela grande eficácia do sistema imune em eliminar partículas virais em circulação (Bale, 1994; Davis, 1995, Diamond, 2003).

Os mecanismos associados ao incomum acesso dos flavivírus encefalitogênicos ao SNC após a viremia não estão satisfatoriamente esclarecidos. Algumas hipóteses propõem que o cruzamento da barreira hematoencefálica ocorre por transporte passivo através do endotélio, por replicação ativa nas células endoteliais, por transporte axonal retrógrado via sistema nervoso periférico ou por um mecanismo do tipo “Cavalo de Tróia” em que o vírus é carregado para dentro do cérebro por células inflamatórias infectadas (Diamond, 2003; King et al., 2007). A hipótese mais aceita é a do “Cavalo de Tróia”. Acredita-se que a infecção de tecidos periféricos por flavivírus aumente a expressão de citocinas, como o $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$, que estimulam a síntese de moléculas de adesão na superfície luminal do endotélio da barreira hematoencefálica e, portanto, favoreça a migração de leucócitos infectados para o SNC (Vries et al., 1996; Shen et al., 1997; Diamond & Klein, 2004). Ainda, a replicação de flavivírus em células de linhagem monocítica, que ocorre durante a fase de viremia da infecção, tem sido fortemente associada ao desenvolvimento de encefalite (King et al., 2003; Rios et al., 2006). Ye et al. (2011) suprimiram completamente o aparecimento de doença encefálica em camundongos infectados com VNO e VESL ao interromper a replicação desses vírus em macrófagos e células dendríticas utilizando RNAi, corroborando com a hipótese do “Cavalo de Tróia”.

Quando introduzidos no SNC, os flavivírus neurotrópicos participam de vários mecanismos que induzem a morte de células neurais, seja pela replicação ativa nas células ou pela indução de apoptose mediada pelo vírus ou resposta imunológica do hospedeiro, com consequentes danos no tecido nervoso. Embora estes vírus apresentem características

patogênicas intimamente associadas à evolução neurológica das arboviroses, a resposta imune do hospedeiro contra estes agentes é provavelmente o principal determinante das manifestações clínicas das encefalites (Turtle et al., 2012). De fato, estudos histopatológicos já demonstraram que ocorre uma expressiva resposta inflamatória no cérebro de humanos e animais que morreram de encefalite causada por flavivírus, incluindo ativação de microglia com formação de nódulos microgliais, infiltração de células fagocíticas e acúmulo perivascular e parenquimal de linfócitos T (Rosemberg, 1980; Omalu et al., 2003; German et al., 2006; Barros et al., 2011).

Existe considerável pesquisa científica sendo realizada com o intuito de melhor compreender as respostas imunes contra os flavivírus. De maneira geral, o controle de uma infecção flaviviral ocorre através de mecanismos físico-químicos realizados por componentes da imunidade inata e adaptativa que visam à eliminação do vírus através da neutralização de partículas livres e destruição das células infectadas (Hinds *et al*, 2008; Abbas et al., 2011). Para constar, Ben-Nathan et al. (1996) demonstraram que a imunossupressão em camundongos feita pela depleção de macrófagos, que participam ativamente de todo processo imunológico, resultou em progressão acelerada de doença encefálica pelo VNO com alta taxa de mortalidade. Contudo, os estudos mostram que as respostas imunes iniciadas contra os flavivírus se comportam tanto de forma protetora quanto patológica, causando prejuízos ao hospedeiro (King et al., 2007).

Nas arboviroses, a primeira barreira de proteção inata, a pele, é facilmente ultrapassada pela picada do vetor, que insere o vírus nos tecidos do hospedeiro. Inicialmente, a resposta imune inata contra os arbovírus é exercida pelas células *Natural Killer* (NK), que induzem a morte das células infectadas, e pelas células locais infectadas, que atuam produzindo citocinas, principalmente interferons tipo I (INFs I), as quais inibem a replicação viral em células infectadas e exercem proteção sobre as células adjacentes não infectadas (Hinds *et al*, 2008; Abbas et al., 2011). Os INFs I (IFN- α e IFN- β) são produzidos por diferentes tipos celulares quando infectados por flavivírus, sendo expressos mediante diversas vias bioquímicas. Essas vias iniciam com a detecção do genoma viral por receptores citosólicos de reconhecimento de patógenos, como os receptores semelhantes a Toll (TLR) 3 e 7, e ativação de receptores de ácido retinóico gene 1 induzível (RIG-1). A sinalização converge para a ativação de proteínas cinases, que por sua vez ativam os fatores de transcrição reguladores de interferon (IRFs), os quais incitam a transcrição dos genes dos INFs I (Hinds *et al*, 2008; Rouse & Seherwat, 2010; Abbas et al., 2011).

O TLR3 tem sido amplamente implicado no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e invasão dos flavivírus no SNC como consequência de reações inflamatórias. Wang et al. (2004) observaram que camundongos infectados com VNO e deficientes na expressão de TLR3, embora apresentassem altos títulos do vírus em tecidos periféricos, não desenvolveram encefalite e tiveram uma taxa de sobrevivência superior em comparação aos animais tratados como controle. Kong et al. (2008) demonstraram que a diminuição da expressão de TLR3 em macrófagos de origem humana resultaram na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e sugeriram que isto poderia dificultar o acesso ao SNC. De outro modo, Qian et al. (2011) observaram que células dendríticas infectadas pelo VNO apresentam maior expressão de TLR3 e uma produção mais intensa de INFs I. Estes dados sugerem que, se por um lado o TLR3 é importante na geração de resposta imune antiviral, por outro ele pode contribuir para a entrada do vírus no SNC.

Os INFs I interagem com receptores presentes nas células infectadas e não infectadas, originando diferentes vias de sinalização intracelular que conduzem a um “estado antiviral”. Esse processo inclui: síntese de enzimas que bloqueiam a replicação viral, sequestro de linfócitos nos gânglios linfáticos, aumento da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (aumentando a probabilidade de reconhecimento das células infectadas por células citotóxicas) e inibição do crescimento celular. Além disso, os elementos estimulados pelos INFs I ativam as células fagocíticas e potencializam a maturação e ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), a citotoxicidade mediada por células NK, a produção de citocinas pró-inflamatórias (que auxiliam no recrutamento de outros tipos celulares e na amplificação da resposta imunológica) e a diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos), que tem a função de induzir apoptose nas células infectadas (Machado *et al*, 2004; Hinds *et al*, 2008; Abbas et al., 2011). Dentre as citocinas pró-inflamatórias que participam da resposta imune inata em infecções do SNC tem destaque: TNF- α , IL-1 e IL-6. Diversos modelos de infecções pelo VEJ e VNO constataram elevada síntese de TNF, o que parece exercer efeitos tanto protetores quanto patogênicos no tecido nervoso (Saxena et al., 2001; Cheng et al., 2004).

Em um segundo momento da infecção flaviviral, a imunidade inata passa a interagir com elementos da imunidade adaptativa (linfócitos T, linfócitos B e anticorpos). A ativação de linfócitos T ocorre mediante dois sinais distintos: a apresentação de antígenos virais por APCs e o co-estímulo com moléculas sintetizadas durante as respostas imunes inatas, em geral citocinas. Os linfócitos T ativados secretam citocinas, por exemplo IL-2 e IL-9, que

estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos T virgens em efetores. O linfócito T CD4⁺ efetor responde ao antígeno viral produzindo citocinas que exercem vários efeitos sobre outras células, quais sejam: IL-2, INF- γ , IL-12, IL-16, IL-19, todas participando do recrutamento e ativação de leucócitos, ativação de macrófagos, linfócitos B e outras células, e maturação de linfócitos T CD8⁺. O linfócito T CD8⁺ efetor responde matando as células infectadas e produzindo citocinas, como o INF- γ , que ativam fagócitos e exercem algum efeito antiviral. Os linfócitos B ativados produzem anticorpos que bloqueiam a ligação e entrada do vírus nas células do hospedeiro (Klenerman & Hill, 2005; Abbas et al., 2011). Algumas células do sistema imune produzem citocinas, como o TGF- β , que regulam a proliferação, diferenciação, ativação e apoptose de outras células, com o objetivo de gerar um balanço nas respostas imunes. Da mesma forma, o TGF- β pode interferir na expressão e atividade de outras citocinas, incluindo INF- γ , TNF- α , IL-2, entre outras (Letterio & Roberts, 1998).

Vários experimentos desenvolvidos em modelos animais de encefalite por flavivírus têm demonstrado a cooperação dos elementos da imunidade adaptativa para a eliminação do vírus (Diamond et al., 2003a, 2003b). Em infecções do SNC, fundamentalmente, todas as células imunocompetentes infiltram no parênquima nervoso: primeiramente, células NK, em seguida, linfócitos T e, depois, linfócitos B e fagócitos (Dorries, 2001). As citocinas que são produzidas por este infiltrado de células incluem INF- γ , IL-4 e IL-10, mas raramente a IL-2 (Chang et al., 2000). Os linfócitos B presentes no SNC produzem anticorpos contra flavivírus, principalmente Imunoglobulina A (IgA) e IgG, que reconhecem epítomos localizados predominantemente na proteína E, inibindo a ligação e internalização dos vírus nas células hospedeiras (Oliphant et al., 2005). Em infecções pelo VEJ foi demonstrado haver uma cooperação entre linfócitos T CD4⁺ e anticorpos neutralizantes para a interrupção da infecção (Biswas et al., 2009). No entanto, os linfócitos T CD8⁺ parecem ter destaque durante a imunidade adaptativa. Larena et al. (2011) observaram que os linfócitos T CD8⁺ são o tipo celular dominante encontrado no SNC de camundongos infectados pelo VEJ. Além disso, Aleyas et al. (2010) forneceu evidências de que o VEJ é capaz de inibir intensamente a resposta dos linfócitos T CD8⁺ ao interferir na apresentação de antígenos, o que poderia se tratar de um mecanismo de escape deste vírus. Shrestha et al. (2004) demonstraram que camundongos *knockout* para linfócitos T CD8⁺ infectados com VNO apresentaram maior letalidade e dispersão viral em comparação aos camundongos tratados como controle. Por outro lado, Wang et al. (2003) observaram que, sob certas circunstâncias, os linfócitos T

CD8⁺ podem ter ação patogênica em infecções pelo VNO.

Embora seja considerado imunoprivilegiado, o SNC possui dois importantes tipos celulares que participam das respostas imunes inatas diante de infecções virais: astrócitos e microglia. Os astrócitos, reconhecidos como células de suporte trófico no SNC, expressam TLRs e produzem um perfil de citocinas que são secretadas mediante à estimulação destes receptores, dentre elas destacam-se IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , demonstrando que são células importantes nas respostas antivirais iniciadas no SNC (Carpentier et al., 2005; So et al., 2006). A microglia consiste em macrófagos residentes do SNC e são funcionalmente semelhantes aos macrófagos teciduais: expressam TLRs importantes no reconhecimento de antígenos virais, processam e apresentam os antígenos aos linfócitos T e produzem grandes quantidades de TNF- α , óxido nítrico e outros mediadores solúveis potencialmente prejudiciais aos neurônios (Kreutzberg, 1996; Olson & Miller, 2004). Chen et al. (2000, 2004) demonstraram que em infecções com o VEJ, microglia e astrócitos aumentam a expressão de quimiocinas como CCL2 e CCL5, as quais tem a capacidade de recrutar células imunocompetentes circulantes e ativar leucócitos no cérebro, que juntos secretam outros mediadores com potencial efeito neurotóxico.

Os neurônios são o alvo celular preferencial em infecção por flavivírus, sendo as demais células infectadas em menor grau (Diniz et al., 2006; Daffis et al., 2008). Samuel et al. (2007) observaram que infecções em neurônios induzem apoptose através de uma via dependente da caspase3; mas também intensa necrose resultante de brotamento viral tem sido demonstrada (Chu et al., 2003; Chambers & Diamond, 2003). Os neurônios participam das respostas imunes de maneira predominantemente parácrina. Quando infectados por flavivírus, os neurônios produzem citocinas pró-inflamatórias, provavelmente INF- β , INF- γ e IL-6, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), que induzem respostas imunes através da sinalização da microglia e dos astrócitos, que por sua vez iniciam sua resposta antiviral e, eventualmente, ocasionam neurotoxicidade (Neumann, 2001).

A maior parte da população de neurônios no SNC é não-regenerativa, portanto as respostas imunes no SNC apresentam certo grau de regulação no intuito de eliminar os vírus e ao mesmo tempo causar o mínimo de dano possível no tecido nervoso e, com isso, evitar distúrbios funcionais no hospedeiro (Griffin, 2003). Os neurônios infectados por flavivírus iniciam rapidamente sua resposta imune com a produção preferencial de INF- β , que é menos neurotóxico em relação ao IFN- α e, portanto, favorece a proteção do tecido neuronal (Akwa et al., 1998). Os neurônios maduros apresentam deficiência na expressão de moléculas do MHC.

Eles respondem ao INF- β apenas com síntese de enzimas antivirais, por exemplo a 2'-5' oligoadenilato sintetase, portanto a citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos é comprometida (Massa et al., 1999). Os neurônios infectados produzem gangliosídeos que inibem a produção de moléculas do MHC em astrócitos e juntamente inibem a produção de IL-2, afetando a proliferação de linfócitos T no parênquima nervoso (Irani et al., 1996). Também, a atividade imune de fagócitos infiltrados no SNC pode ser controlada pela produção de TGF- β (Gordon et al., 1998).

Os neurônios e muitas células gliais apresentam alta resistência à indução de apoptose, seja mediada pelo vírus ou por células citotóxicas, provavelmente por causa da expressão de inibidores apoptóticos, como bcl-2, bcl-x e mcl-1 (Marten et al., 2000). De acordo com Griffin (1995, 2003), infecções nestas células contribuem para a persistência dos flavivírus no tecido nervoso, uma vez que o mecanismo mais eficiente de eliminação viral, a destruição de células infectadas, torna-se comprometido. De fato, embora havendo controvérsias, infecções persistentes do VNO tem sido relatadas em animais vertebrados (Pogodina et al., 1984; Tesh et al., 2005; Appler et al., 2010; Stewart et al., 2011). Também, infecção persistente do VROC foi relatada em hamsters (Henriques et al., 2012). Em humanos, apesar de infecção persistente ainda não ter sido documentada, anticorpos IgM já foram detectados no líquido cefalorraquidiano de pacientes acometidos de encefalite causada pelo VNO por um período de mais de 5 meses (Kapoor et al., 2004), e de pacientes acometidos de encefalite causada pelo VEJ por mais de 6 meses (Ravi et al., 1993), reforçando que os flavivírus podem persistir no SNC de indivíduos acometidos por infecções, mesmo estando convalescentes.

2 JUSTIFICATIVA

O VROC é antigenicamente relacionado ao VESL e ao VNO formando um grupo sorológico com o vírus da encefalite japonesa (JEC). Esses agentes são responsáveis por severas doenças de importância epidemiológica e, portanto, são os flavivírus de maior preocupação em saúde pública nos países da América do Sul, incluindo o Brasil. De modo particular, o desconhecimento sobre as causas do surgimento e desaparecimento do VROC na epidemia de grave encefalite no Vale do Ribeira durante a década de 70, aliado a evidências da circulação deste vírus em diversos outros locais do Brasil, incidem-no como uma grave ameaça de ocorrência de novos e abruptos surtos de encefalite (Figueiredo et al., 1986; Figueiredo, 2007; Figueiredo MLG & Figueiredo LTM, 2014).

Em geral, os flavivírus são habilitados a infectar uma ampla variedade de linhagens de células de vertebrados e invertebrados *in vitro* (Travassos da Rosa et al., 1994). O cultivo primário é um modelo alternativo bastante vantajoso em substituição ao modelo *in vivo*, pois permite o estudo a nível celular mais individualizado e nele as células preservam as características genotípicas e fenotípicas do tecido de origem (Moraes et al., 2007). Considerando-se o forte potencial encefalitogênico do VROC, é de grande relevância estudar a patogenia deste agente em sistemas que simulem o SNC no intuito de melhor elucidar as características intrínsecas à evolução neurológica da doença causada por este agente. Até o momento, os poucos estudos desenvolvidos com o VROC utilizaram predominantemente modelos experimentais *in vivo*, não havendo relatos na literatura científica da utilização de cultura primária de células do SNC como modelo *in vitro* para infecção pelo VROC.

A patogênese das encefalites causadas por flavivírus ainda não está completamente esclarecida. Muitos aspectos inerentes à invasão viral no SNC, à replicação viral nas células neurais e à natureza das respostas imunes do hospedeiro carecem por ser desvendados (Turtle et al., 2012). Em infecções do SNC por flavivírus, as citocinas produzidas localmente desempenham um papel importante na modulação das respostas imunes, pois estimulam as reações antivirais das células neurais e regulam a adesão, a quimiotaxia, a ativação e diferenciação de células imunomoduladoras, estando diretamente associadas tanto a eliminação viral do SNC quanto a neurotoxicidade imuno-mediada. Desse modo, o estudo de citocinas envolvidas em infecções de células neurais causadas pelo VROC, realizadas *in vitro*,

pode contribuir sobremaneira para a melhor compreensão da imunopatologia das infecções do SNC por flavivírus, além de auxiliar no combate a este tipo de doença.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar o padrão de expressão gênica de citocinas em cultura primária de células neurais submetidas à infecção pelo vírus Rocio.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a capacidade do VROC de infectar cultura primária de células neurais;
- Descrever a cinética de morte da cultura primária de células neurais infectada pelo VROC;
- Quantificar a replicação viral em função do período infeccioso;
- Relacionar a cinética de morte da cultura primária de células neurais com a carga viral presente na cultura primária de células neurais infectada, em função do período infeccioso.
- Quantificar a expressão das citocinas INF- α , INF- β 1, INF- γ , TNF- α , IL-1 β e TGF- β produzidas pelas células neurais durante a infecção viral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo utilizou camundongos isogênicos da linhagem BALB/c neonatos, machos ou fêmeas, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará (IEC/PA). O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do IEC (CEUA/IEC) com o número de protocolo 021/2014 (anexo 1). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA (2013).

4.2 AMOSTRAS E ESTOQUE VIRAL

Para o presente estudo utilizou-se a cepa do VROC (SP H 34675) proveniente do acervo de isolados virais da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC). O uso da referida amostra foi previamente aprovado pela direção do IEC (anexo 2).

O estoque viral foi preparado conforme previamente descrito por Henriques et al. (2012). Amostras liofilizadas do VROC foram reconstituídas com 0,5 mililitro (ml) de água destilada estéril e 0,5 ml de solução salina tamponada (PBS, pH = 7,4) contendo 0,75% de albumina bovina, 100 UI/ml de penicilina e 100 microgramas por mL ($\mu\text{g/mL}$) de estreptomicina. Uma vez reconstituídas, 0,02 ml da amostra foi inoculada por via intracerebral (IC) em camundongos isogênicos da linhagem BALB/c recém-nascidos com 2 - 3 dias de vida (n=24). Em seguida, os animais foram observados diariamente até o aparecimento de sinais da doença. Os camundongos que apresentaram sinais de doença foram sacrificados, identificados e conservados a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso futuro. Esse procedimento foi realizado em laboratório com nível de biossegurança animal 3 (NBA3).

Uma suspensão viral foi preparada a partir do cérebro desses camundongos. Para tanto, 1 cérebro foi macerado em PBS (pH = 7,4) contendo 0,75% de albumina bovina, 100 UI/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. A mistura obtida foi centrifugada a uma velocidade de 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido com auxílio de seringa de 5mL descartável e, em seguida, filtrado. 1 ml da suspensão viral filtrada foi inoculada em

de cultura de células VERO, uma linhagem estabelecida a partir de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), contendo 9 mL de meio de cultivo 199 com 5% de soro bovino fetal (SBF) em garrafa de cultura de 25 cm². A cultura inoculada foi observada diariamente em microscópio invertido até ser observado o surgimento de efeito citopatogênico do referido vírus em 70% das células.

1 mL do meio desta cultura foi inoculado em outras duas culturas de células VERO cultivadas em 24 mL de meio 199 com 5% de SBF em garrafas de cultura de 75 cm². Tais culturas foram observadas diariamente até ser identificado efeito citopatogênico em 70% das células. Por conseguinte, as culturas foram estocadas à temperatura de -70 °C e depois de 48 horas foram descongeladas no intuito de favorecer a lise das células. A cultura foi então aliquotada em microtubos de 1 (mL), os quais foram identificados e estocados à temperatura de -70 °C para uso futuro. Esse procedimento foi realizado em laboratório com nível de biossegurança 3 (NB3).

4.3 PRODUÇÃO DE SOROS HOMÓLOGOS

Os soros homólogos ao VROC e a vírus do grupo B utilizados no presente estudo foram gentilmente cedidos pelo Doutor Pedro Vasconcelos (IEC). A produção de soros homólogos ao VROC e a vírus do grupo B foi feita em camundongos albinos adultos (três a quatro semanas de vida). Para tal, quatro inoculações foram administradas via intraperitoneal (IP) em intervalos de sete dias, na quantidade de 0,2 mL de suspensão de cérebro de camundongos infectados pelo VROC e vírus do grupo B, preparada na proporção de 1:10 em solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%). Após o intervalo de uma semana da última inoculação, coletou-se o sangue dos animais imunizados por punção cardíaca. O sangue obtido foi centrifugado a 3.000 rpm por dez minutos, a 4° C. O soro foi separado, identificado e conservado a temperatura de -20°C para uso futuro nos testes de detecção de antígenos virais.

4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para confirmar e estimar o grau de replicação viral na cultura de células VERO inoculada com a suspensão viral feita com os cérebros dos animais inoculados IC com o VROC realizou-se a pesquisa de antígenos virais do VROC e de vírus do grupo B na cultura

inoculada através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com protocolo descrito por Tesh (1979), utilizando-se anticorpos policlonais preparados para o VROC obtidos em camundongos (item 4.2).

A técnica de IFI foi feita em duplicata. Para tal, preparou-se duas lâminas de oito *spots*, uma para detecção de antígenos do VROC e outra para detecção de antígenos de vírus do grupo B, cada uma compreendendo: seis *spots* com 20 microlitros (μL) da suspensão de células VERO infectadas e, para o controle negativo, dois *spots* com 20 μL de suspensão de células VERO não-infectadas. Fez-se a secagem das lâminas à temperatura ambiente (TA) e, posteriormente, fixou-se com acetona gelada por 10 minutos. A formação do complexo antígeno-anticorpo foi feita pela adição de 10 μL de soro homólogo para o VROC e para vírus do grupo B, diluídos 1:20 em PBS pH 7,4 em cada *spot* das duas lâminas usadas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em estufa a 37 °C, em câmara úmida durante 30 minutos. Lavou-se as lâminas em PBS pH 7,4, passou-se rapidamente em água destilada e deixou-se secar à Temperatura Ambiente (TA).

Em seguida, foi adicionado 10 μL do conjugado anti-imunoglobulina de camundongo marcada com fluoresceína, diluído 1:900 em PBS pH 7,4. Colocaram-se as lâminas em estufa a 37 °C, em câmara úmida durante 30 minutos. Lavou-se as lâminas em PBS pH 7,4, por imersão durante 10 minutos, passou-se rapidamente em água destilada e deixou-se secar à TA. A montagem da lâmina para leitura foi feita pela adição de uma gota de glicerol tamponado e colocação da lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência, adotando-se um tempo igual de leitura de 30 segundos para cada *spot*.

4.5 TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL

A titulação do estoque viral foi realizada a partir do preparo de diluições seriadas de dez vezes (de 10^{-1} a 10^{-8}) de uma alíquota da suspensão viral previamente estocada (item 4.1). As diluições foram inoculadas em culturas de células VERO cultivadas em placas de seis poços (diâmetro de 35 mm e área de crescimento de 9,6 cm^2 por poço) em meio 199 com 5% de SBF. Para tal, o meio de cultivo das células foi removido e, começando da menor para a maior diluição, 100 μL de cada uma das diluições foram adicionados nos respectivos poços em duplicata. Poços controle inoculados com meio de cultivo 199 com 2% de SBF estéril foram incluídos no teste. As placas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO_2 em atmosfera umidificada durante uma hora para favorecer a adsorção viral. A seguir, 3 mL

de meio 199 com 3% de Carboximetilcelulose (CMC) foram adicionados em cada poço e, então, as placas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada durante sete dias. Após esse período, realizou-se a fixação em paraformaldeído a 10% durante 6 horas, seguida de lavagem em água corrente, coloração overnight com corante cristal violeta e, novamente, lavagem em água corrente.

O título viral foi determinado pela análise do plaqueamento da cultura e expresso em PFU/ml (unidades formadoras de placa por mililitro de meio de cultura), que indica o número de partículas virais infectantes presentes em 1 mL do estoque viral. O cálculo do título viral foi feito aplicando-se a fórmula: $PFU/mL = n \times FC \times 10^d$; onde “n” é a média do número de placas de lise formadas nos dois poços inoculados com a maior diluição geradora de placas isoladas, “FC” é o fator de correção (número pelo qual o valor do inóculo utilizado deve ser multiplicado para que se obtenha 1mL, nesse caso foi 10), e “10^d” é o inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de “n”.

4.6 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos neonatos, machos ou fêmeas, da linhagem BALB/c com até dois dias de idade, provenientes do Biotério do IEC (n=50). Os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por decapitação obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (2013), a decapitação foi realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de petri contendo etanol 70%. As cabeças dos animais foram levadas para dentro da cabine para que o encéfalo fosse removido – este procedimento foi realizado sobre uma placa de petri contendo meio de dissecação estéril gelado. O encéfalo foi triturado com auxílio de uma tesoura e incubado por um período de 5 a 10 minutos a 37 °C em solução de tripsina-EDTA 0,05% livre de cálcio e magnésio para que o tecido sofresse digestão enzimática. Em seguida, o material foi transferido para tubo falcon de 15 mL contendo meio de cultura DMEM com 10% de SBF para ser triturado mecanicamente com auxílio de uma pipeta Pasteur. A suspensão celular ficou em repouso por 2 minutos para que houvesse decantação do excesso de material encefálico e o sobrenadante foi coletado. A densidade celular do sobrenadante foi mensurada com o auxílio de câmara de Neubauer utilizando-se 50 µL de azul de Trypan, 40 µL de solução salina e 10 µL de suspensão celular.

Para obtenção de culturas mistas (neurônio/glia), as células contidas no sobrenadante

foram cultivadas a uma densidade de 5×10^5 células/poço em placas de cultura de 24 poços (diâmetro de 15,4 mm e área de crescimento de 1,91 cm² por poço) cobertas com poli-L-lisina contendo 1,5 ml do meio de cultura Neurobasal (NBA) suplementado com 10% de SBF, 25 µM de glutamato, 100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAXTM (Gibco) e 0,25 mM de L-glutamina por poço e mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. Após 24 horas, esse meio foi trocado e depois a troca foi feita a cada três dias (Gao *et al.*, 2002; Martins-Filho, 2011).

4.7 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS POR IMUNOCITOQUÍMICA

O teste de imunocitoquímica foi realizado de acordo com protocolo do fabricante de Kit para Imunoensaios (DAKO). Para caracterização fenotípica das culturas primárias mistas, realizou-se a imunocitoquímica de acordo com protocolo descrito por Kim *et al.* (2000) com modificações. Os neurônios foram marcados com anticorpos contra a proteína NeuN (anti-NeuN), uma proteína que se liga ao DNA e é restrita ao núcleo de neurônios maduros. Os astrócitos foram marcados com anticorpos contra a proteína acídica fibrilar glial (anti-GFAP), um filamento intermediário característico dessas células. A microglia foi marcada com anticorpos contra a molécula ionizada adaptadora de ligação ao cálcio 1 (anti-Iba 1).

No sétimo dia da cultura primária de neurônios e células gliais, o meio de cultivo foi removido e as células foram lavadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos à TA. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e fez-se o bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ 3% por 5 minutos. Então, realizou-se outra lavagem em PBS e as células foram incubadas com soro de cabra 10% (BSA) à TA por 30 minutos para que houvesse o bloqueio de proteínas inespecíficas. Outra vez lavou-se com PBS e incubou-se as células *overnight* a 4 °C em anticorpos primários diluídos em PBS nas seguintes proporções: anti-NeuN 1:500; anti-GFAP 1:1000; anti-Iba 1 1:500. Poços controle tratados sem a etapa de incubação em anticorpo primário foram incluídos no teste.

Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos cada e, em seguida, incubadas por 30 minutos em anticorpo secundário biotilado. A partir disso, as células foram lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos cada e incubadas com Streptavidina conjugada à enzima peroxidase. Novamente, lavou-se as células duas vezes com PBS por 5 minutos cada e o imunocomplexo foi revelado através da

incubação com substrato cromógeno Diaminobenzidina (DAB) por 40 segundos a 1 minuto. A revelação foi cessada com lavagem em água destilada por 5 minutos e as células foram analisadas em microscópio invertido.

4.8 INFECCÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS

As culturas primárias mistas foram infectadas com VROC no sétimo dia de cultivo, quando a monocamada de células apresentou-se suficiente densa e estabelecida. O volume do inóculo viral, proveniente do estoque viral (item 4.1), obedeceu a um índice de multiplicidade de infecção (MOI) igual a 2. O meio de cultivo (NBA suplementado com 10% de SBF, 100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAXTM e 0,25 mM de L-glutamina) foi completamente removido e o inóculo contendo aproximadamente 1×10^6 viríons infectantes foi adicionado aos poços. Poços tratados como controle negativo foram inoculados utilizando-se apenas meio de cultivo NBA estéril, e as células foram submetidas às mesmas condições das células inoculadas com o vírus. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada durante uma hora para favorecer a adsorção viral. Após esse período, o inóculo foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS antes de se adicionar o meio de cultivo NBA fresco. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada e observadas diariamente quanto a mudanças citopatogênicas utilizando-se microscópio invertido. Não houve troca de meio de cultivo após a inoculação.

4.9 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS DO VROC POR IMUNOCITOQUÍMICA

O teste de imunocitoquímica foi realizado de acordo com protocolo do fabricante de Kit para Imunoensaios (DAKO). Para detecção de antígenos virais do VROC nas culturas primárias inoculadas com VROC, utilizaram-se anticorpos policlonais preparados para o VROC obtidos em camundongos (item 4.2)

Os anticorpos específicos anti-VROC foram purificados do soro homólogo dos animais imunizados através de imunoprecipitação. Para tal, um cérebro estéril de camundongo foi macerado em PBS (pH = 7,4) contendo 0,75% de albumina bovina, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina na proporção de 1:10. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min e o sobrenadante removido e incubado *overnight* a 37 °C com o anti-

soro diluído na proporção 1:200 em PBS pH 7,4. A mistura foi então centrifugada a uma velocidade de 10.000 rpm por 15 minutos afim de precipitar o imunocomplexo com anticorpos inespecíficos. O sobrenadante, contendo os anticorpos anti-VROC purificados, foi removido e conservado à 4 °C.

No quinto dia após a infecção (p.i), o meio de cultivo foi removido e as células foram lavadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos à TA. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e fez-se o bloqueio da peroxidase endógena em H₂O₂ 3% por 5 minutos. Então, realizou-se outra lavagem em PBS e as células foram incubadas com soro de cabra 10% (BSA) à TA por 30 minutos para que houvesse o bloqueio de proteínas inespecíficas. Outra vez lavou-se com PBS e incubou-se as células *overnight* a 4 °C em anticorpo primário anti-VROC. Poços controle tratados sem a etapa de incubação em anticorpo primário foram incluídos no teste.

Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos cada e, em seguida, incubadas por 30 minutos em anticorpo secundário biotilado. A partir disso, as células foram lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos cada e incubadas com Streptavidina conjugada à enzima peroxidase. Novamente, lavou-se as células duas vezes com PBS por 5 minutos cada e o imunocomplexo foi revelado através da incubação com substrato cromógeno Diaminobenzidina (DAB) por 40 segundos a 1 minuto. A revelação foi cessada com lavagem em água destilada por 5 minutos e as células foram analisadas em microscópio invertido.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DO VROC NAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS NEURAIIS INFECTADAS

Realizou-se a quantificação da replicação viral das culturas primárias mistas infectadas pelo VROC, durante 5 dias p.i., empregando-se o método da titulação viral em intervalos de 24 horas, conforme descrito no item 4.4. Prepararam-se diluições seriadas de dez vezes (de 10⁻⁴ a 10⁻⁸) do meio de cultivo das culturas primárias mistas infectadas pelo VROC. As diluições foram inoculadas em culturas de células VERO cultivadas em placas de seis poços (diâmetro de 35 mm e área de crescimento de 9,6 cm² por poço) em meio 199 com 2% de SBF. Para tal, o meio de cultivo das células foi removido e, começando da menor para a maior diluição, 100 µL de cada uma das diluições foram adicionados nos respectivos poços em duplicata. Poços controle inoculados apenas com meio de cultivo das culturas primárias

mistas não infectadas pelo VROC foram incluídos no teste. As placas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada durante uma hora para favorecer a adsorção viral. A seguir, 3 mL de meio 199 com 3% de CMC foram adicionados em cada poço e, então, as placas foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada durante sete dias. Após esse período, realizou-se a fixação em paraformaldeído a 10% durante 6 horas, seguida de lavagem em água corrente, coloração *overnight* com corante cristal violeta e, novamente, lavagem em água corrente.

O título viral foi determinado pela análise do plaqueamento da cultura e expresso em PFU/ml (unidades formadoras de placa por mililitro de meio de cultura), que indica o número de partículas virais infectantes presentes em 1 mL do meio de cultivo. O cálculo do título viral foi feito conforme já descrito no item 4.4.

4.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Realizou-se a extração de RNA total das culturas primárias mistas utilizando o kit de purificação de RNA total MAXWELL 16 Cell LEV na plataforma MAXWELL, conforme protocolo recomendado pelo fabricante, em intervalos de 24 horas p.i. durante 5 dias. Para tal, o meio de cultivo foi removido e a monocamada de células neurais sofreu desintegração durante 2 minutos pela adição de 200 µl de tripsina em cada poço. Em seguida, as células foram ressuspensas em 500 µl de meio de cultivo DMEN contendo 10% de SBF e a suspensão celular foi centrifugada a 5.000 rpm durante 3 minutos. RNA total foi purificado a partir da lise do precipitado de células, eluído em 50µl de água livre de DNase/RNase e armazenado a -70 °C até o uso. O RNA total da cultura tratada como controle negativo foi extraído no quinto dia após a infecção da cultura primária mista.

4.12 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR RT-qPCR EM TEMPO REAL

A detecção de citocinas por RT-qPCR em tempo real foi feita pelo método de RT-qPCR de um passo só. 6 importantes citocinas reconhecidamente produzidas por células neurais e associadas à imunopatologia das encefalites flavivirais, tanto com ação neurotóxica quanto neuroprotetora, foram selecionadas para o presente estudo: INF- α , INF- β , INF- γ , IL-1 β , TNF- α e TGF- β (tabela 1).

Os iniciadores foram fornecidos em microplacas contendo bibliotecas para genes de

citocinas e genes controle em camundongos (MCA-I e MCA-II, 2013). A síntese de cDNA foi realizada acrescentando-se 2µg de RNA a 30µL de uma mistura contendo: iniciadores a 10 µM (Genone, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), dNTPs a 1mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), tampão 1X (Tris-HCl 20mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2mM), 20U de inibidor de ribonuclease e 50U da transcriptase reversa Superscript II (Gibco, Carlsbad, CA, USA). A reação foi incubada em placas de 96 poços no equipamento ViiA 7 Applied Biosystem a uma temperatura de 45 °C durante 15 minutos.

Tabela 1. Citocinas produzidas pelo SNC em infecções virais

Citocina	Principal Fonte Celular	Efeito Biológico
INF- α	Neurônios	Estado antiviral; ativação de células gliais
INF- β	Neurônios	Estado antiviral; ativação de células gliais
INF- γ	Neurônios	Estado antiviral; Ativação de células gliais
IL-1 β	Astrócitos e Microglia	Inflamação
TNF- α	Astrócitos e Microglia	Inflamação; Apoptose
TGF- β	Neurônios e Células Gliais	Regulação Negativa

As reações de PCR em tempo real foram iniciadas logo em seguida no mesmo equipamento. Utilizou-se o reagente “SYBR-Green PCR Master MIX” (Applied Biosystems, EUA). A reação foi realizada em 40 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C, de acordo com o manual do fabricante. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$; onde Rn^+ = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX em um dado

momento da reação, e Rn^- = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação).

O composto ROX foi utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência emitida tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência emitida pelo SYBR-Green aumenta à medida que este se liga nas duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, previamente foi estabelecido um valor de ΔRn , que é uma linha de corte (Threshold) para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o Threshold corresponde ao Ct (cycle threshold) da amostra. O valor de Ct é preditivo da quantidade de RNA mensageiro (mRNA) alvo presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método de $1/2^{\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ gene alvo – Ct gene referência, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra – ΔCt controle.

A especificidade dos iniciadores foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio que mantém as duplas fitas unidas se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR-Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando se observa somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou *melting point* (T_m) do produto de amplificação (amplicon).

O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para o cálculo da expressão gênica assume que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene de referência é igual a 2, ou seja, 100%. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/slope)}$, onde E corresponde à eficiência e slope corresponde ao coeficiente de angulação da curva.

O valor de expressão gênica dos genes alvos nas culturas tratadas como controle foi normalizado com o valor de expressão do gene endógeno (β -actina) e definido como igual a 1. A expressão relativa dos genes alvos nas culturas infectadas com o VROC foi estabelecida

comparando-se o seu valor de expressão com o valor normalizado de expressão dos genes alvos nas culturas tratadas como controle.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad- Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA). Dados não paramétricos foram apresentados como média e desvio padrão. As diferenças observadas entre os grupos foram analisadas pelo teste de Kruskal Wallis (ANOVA de um critério), seguido pelo pós-teste de Dunns. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ utilizando um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL

Os animais inoculados via intracerebral pela amostra liofilizada do VROC adoeceram a partir do 3º dias após a inoculação. Os sinais de doença apresentados foram paralisia, tremores e prostração.

A cultura de células VERO inoculada com a suspensão viral preparada a partir dos cérebros dos animais doentes começou a apresentar efeito citopatogênico a partir do 2º dia p.i. e 70% das células apresentaram efeito citopatogênico no 4º p.i., que se manifestou pela destruição da monocamada celular, formando espaços característicos de morte celular. As outras duas culturas maiores de células VERO inoculadas com amostras extraídas a partir da primeira cultura começaram a apresentar efeito citopatogênico a partir do 4º dia p.i. e 70% das células apresentaram efeito citopatogênico no 5º p.i..

A imunofluorescência indireta realizada a partir de amostras da primeira cultura coletadas no 4º dia p.i. apresentou forte reatividade (+++) na detecção de antígenos virais do VROC e vírus do grupo B, em relação ao controle negativo (figura 4).

A Titulação do Estoque Viral apresentou plaqueamento da cultura até a diluição 10^{-5} do estoque (figura 5). O estoque viral apresentou título igual $4,7 \times 10^6$ PFU/mL. Não houve formação de placas de lise nos poços tratados como controle.

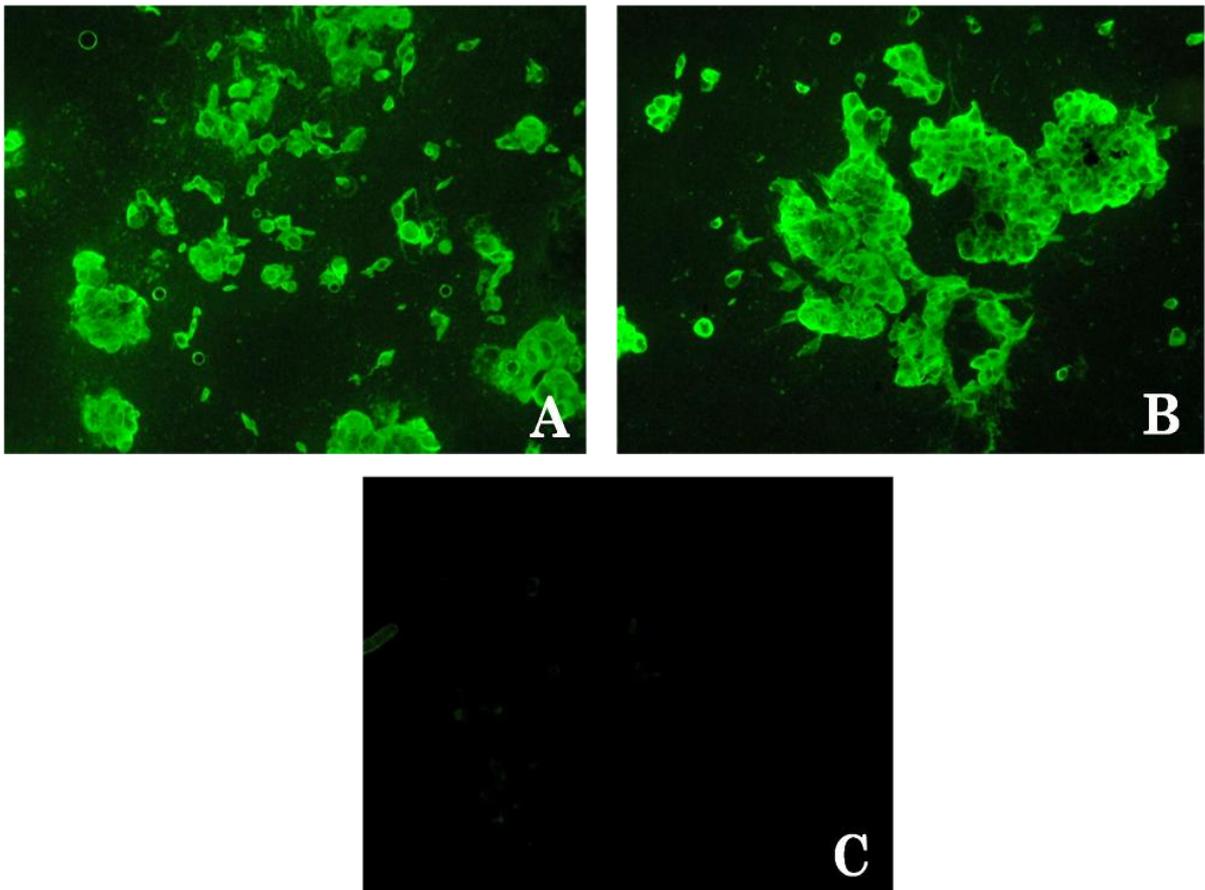


Figura 4. (A) Imunofluorescência Indireta de células VERO infectadas pelo VROC com 4 dias p.i. marcadas com anticorpo policlonal anti-VROC; (B) Imunofluorescência Indireta de células VERO infectadas pelo VROC com 4 dias p.i. marcadas com anticorpo policlonal anti-grupo B; (C) Imunofluorescência Indireta de células VERO não infectadas. (200x).

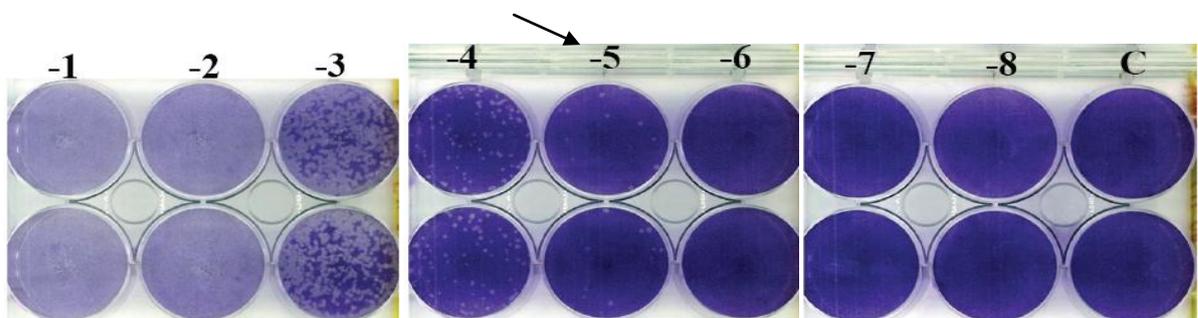


Figura 5. Titulação do Estoque Viral em placas de 6 poços feita em duplicata com oito diluições e controle negativo (C). Placas contáveis e isoladas observadas até a diluição 10^{-5} (seta).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIS

A monocamada de células neurais apresentou-se suficientemente densa e estabelecida a partir do 7º dia de cultivo. A identificação do fenótipo celular presente nas culturas primárias de células neurais realizada pelo experimento de imunocitoquímica com anticorpos para detecção de neurônios (anti-NeuN), astrócitos (anti-GFAP) e microglia (anti-Iba 1) revelou uma composição celular heterogênea, sendo detectados os três tipos celulares (Figura 6).

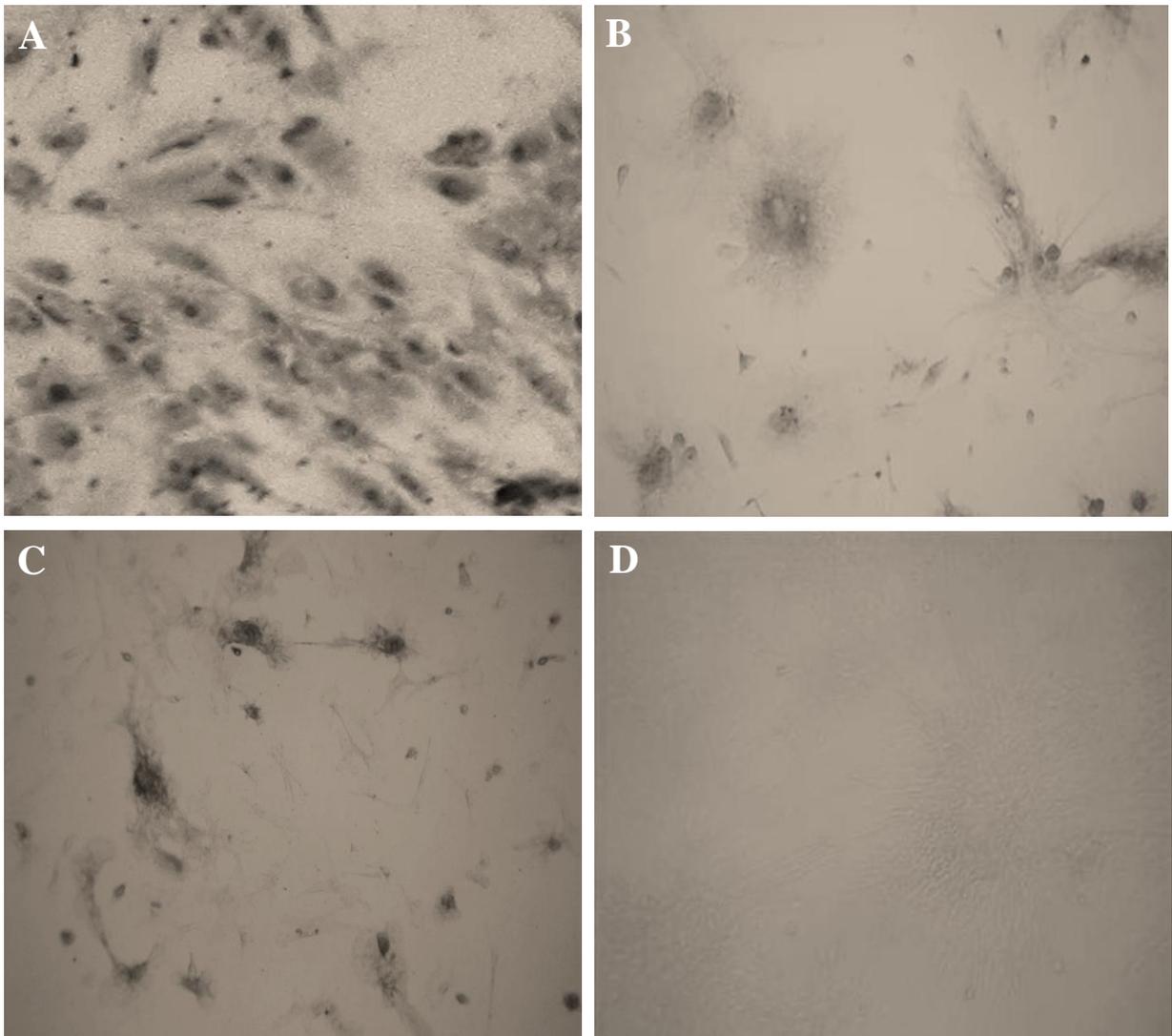


Figura 6. (A) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais marcadas com anticorpo anti-NeuN; (B) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais marcadas com anticorpo anti-GFAP; (C) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais marcadas com anticorpo anti-Iba 1; (D) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais incubadas sem anticorpo primário, tratada como controle. (200x).

5.3 CINÉTICA DE MORTE DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS NEURAIIS INFECTADAS COM O VROC

As culturas primárias de células neurais foram inoculadas pelo VROC por volta do sétimo dia de cultivo, quando a monocamada de células neurais apresentou-se suficientemente densa e estabelecida. Após a inoculação, as culturas tratadas como controle negativo permaneceram saudáveis por até seis dias, não sendo observadas alterações morfológicas durante esse período (Figura 7a). A partir do 7º dia p.i., estas culturas começaram a morrer, tendo células se desprendendo do fundo dos poços e a monocamada celular sendo progressivamente reduzida até a morte completa da cultura no 10º dia p.i..

Comparadas às células do controle negativo, as células inoculadas pelo VROC começaram a apresentar efeito citopatogênico a partir do 2º p.i., sendo observadas poucas células com alterações morfológicas, tais como granulações e agregação celular, e pouca desintegração da monocamada de células (Figura 7b), que se mantiveram constantes até o 5º dia p.i.. A partir do 6º dia p.i., a morte celular se acentuou e a monocamada de células foi se reduzindo progressivamente até a morte completa da cultura no 7º dia p.i. (Figura 7c).

A detecção de antígenos virais do VROC por imunocitoquímica na cultura primária de células neurais, feita no 5º dia p.i., revelou forte reatividade (+++) (Figura 8a) em relação às células tratadas como controle negativo, que foram inoculadas apenas com meio de cultivo NBA estéril (Figura 8b).

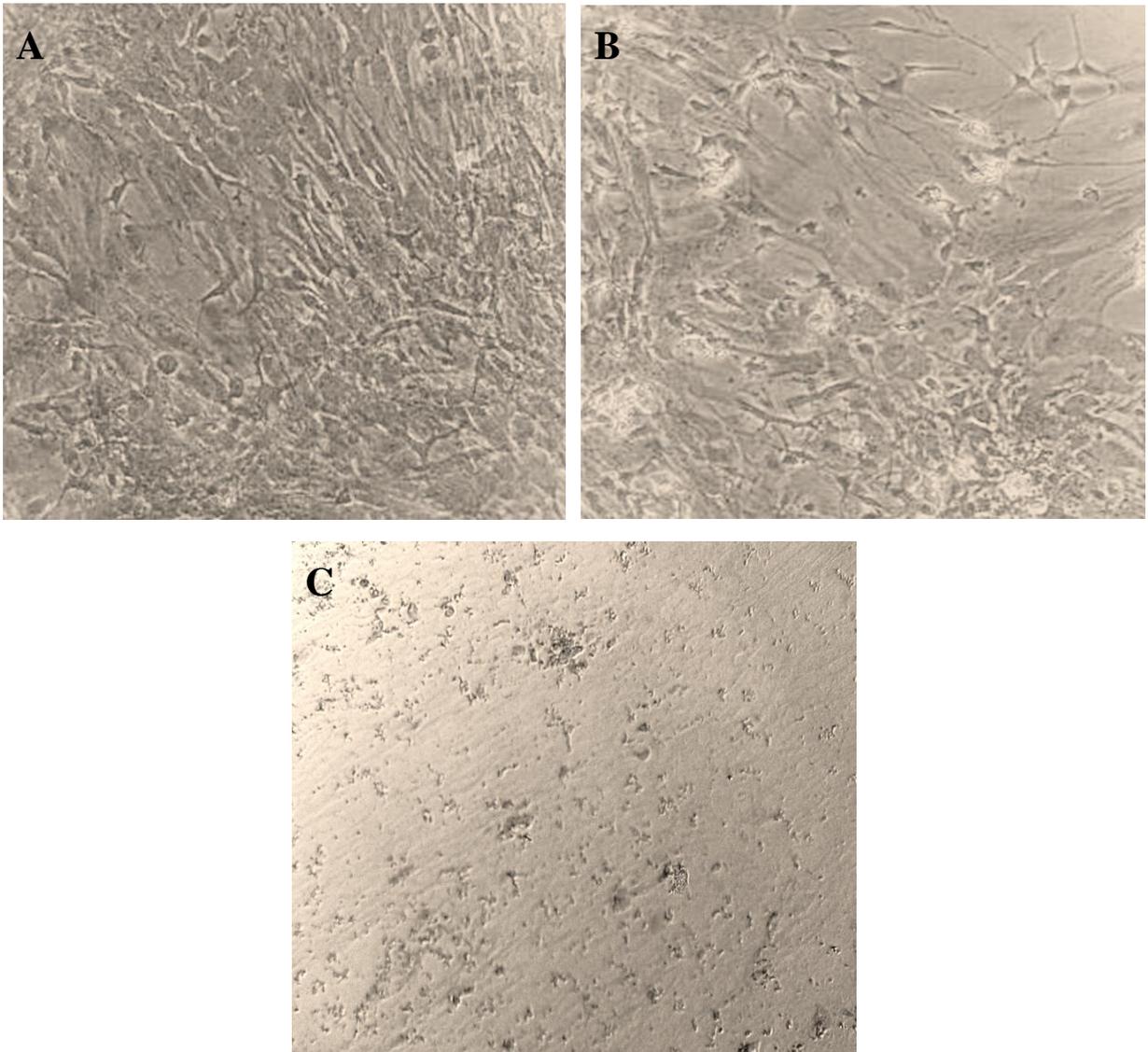


Figura 7. Cultura primária de células neurais inoculadas com o VROC. (A) Controle, monocamada de células no 5º dia pós-inoculação com meio de cultivo NBA estéril; (B) Monocamada de células no 2º dia pós-inoculação com o VROC; (C) Monocamada de células no 7º dia pós-inoculação com o VROC. (200x).

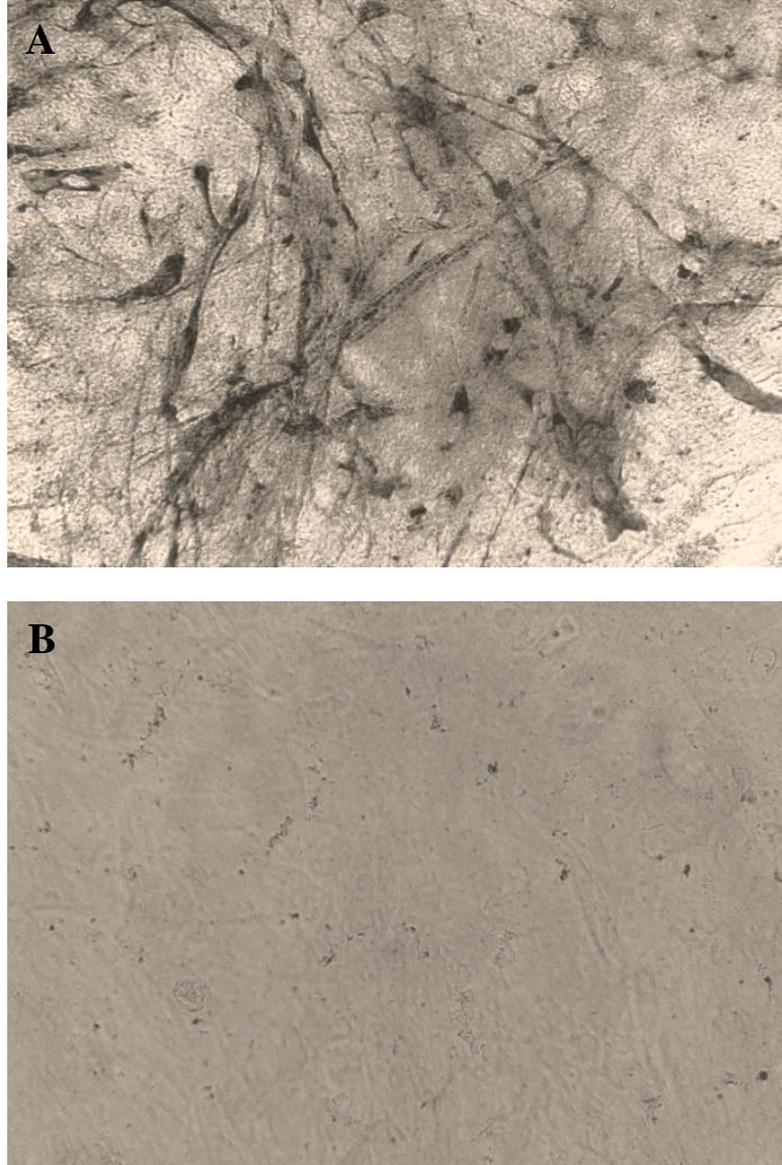


Figura 8. (A) Imunocitoquímica da cultura primária de células neurais infectadas com o VROC e incubadas com anticorpo policlonal anti-VROC; (B) Imunocitoquímica de cultura primária de células neurais inoculadas com meio de cultivo NBA estéril incubadas com anticorpo policlonal anti-VROC. (200x).

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DO VROC NAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS NEURAIS INFECTADAS EM FUNÇÃO DO PERÍODO INFECCIOSO

A quantificação da replicação viral em função do período infeccioso, feita pelo método da titulação viral utilizando amostras do meio de cultivo das culturas primárias após infecção com o VROC, revelou títulos virais no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia p.i., respectivamente, de 1×10^7 pfu/mL, 1×10^8 pfu/mL, 1×10^7 PFU/mL, 1×10^6 PFU/mL e 7×10^5 PFU/mL (Figura 9). Nenhuma partícula viral infectante foi detectada no material tratado como controle negativo. Tomando-se como base o título viral do inóculo ($4,7 \times 10^6$ PFU/ mL), pode inferir que houve aumento de aproximadamente 2 vezes na quantidade de vírions infectantes no 1º dia p.i. e de 10 vezes no 2º dia p.i. em relação ao dia anterior. Já no 3º e 4º dia p.i, houve redução de 10 vezes na quantidade de vírions infectantes em relação ao dia anterior. No 5º dia p.i. houve redução de 70% na quantidade de vírions infectantes.

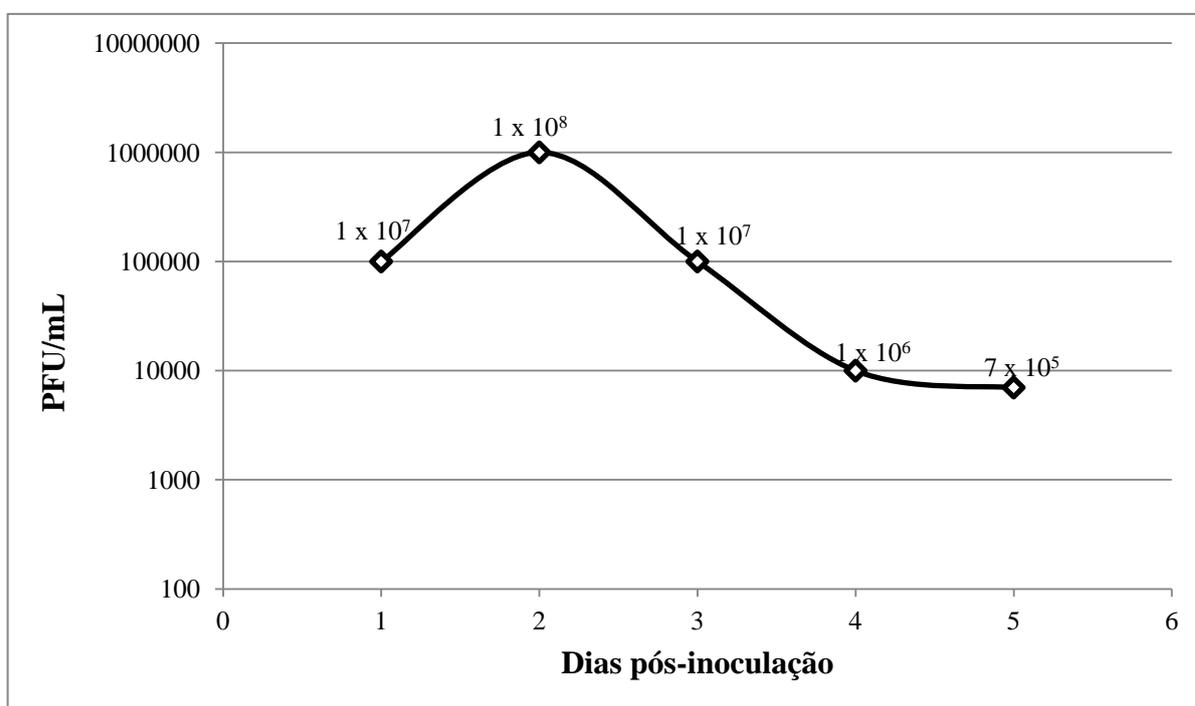


Figura 9. Título viral do VROC em meio de cultivo de células neurais primárias infectadas com 1×10^6 vírions infectantes, de acordo com o período infeccioso.

5.5 PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS

A detecção de citocinas por RT-qPCR revelou o padrão de expressão gênica das citocinas INF- α , INF- β , INF- γ , TNF- α , IL-1 β e TGF- β pelas células neurais primárias infectadas com o VROC durante cinco dias de infecção em comparação as células neurais primárias não infectadas, tratadas como controle. A expressão de INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) durante os cinco dias p.i. em relação ao controle (figuras 10, 11, 12 e 13). Não houve diferença significativa na expressão de INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β entre os cinco dias p.i., mantendo-se um padrão constante de expressão durante todo o período analisado. A taxa média de redução na expressão gênica de INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β foi de, respectivamente, 4,24, 6,77, 6,34 e 3,53 vezes, em relação ao controle. A expressão de TNF- α , embora sutilmente aumentada durante os cinco dias p.i., não apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$) (figura 14). A expressão de TGF- β apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no 1º, 3º e 5º p.i e alterações não significativas no 2º e 4º dia p.i., em relação ao controle (figura 15). A taxa de aumento na expressão de TGF- β no 1º dia p.i. foi de quase 2 vezes, no 3º dia p.i. foi de 3,33 vezes e no 5º dia p.i foi de 1,69 vezes.

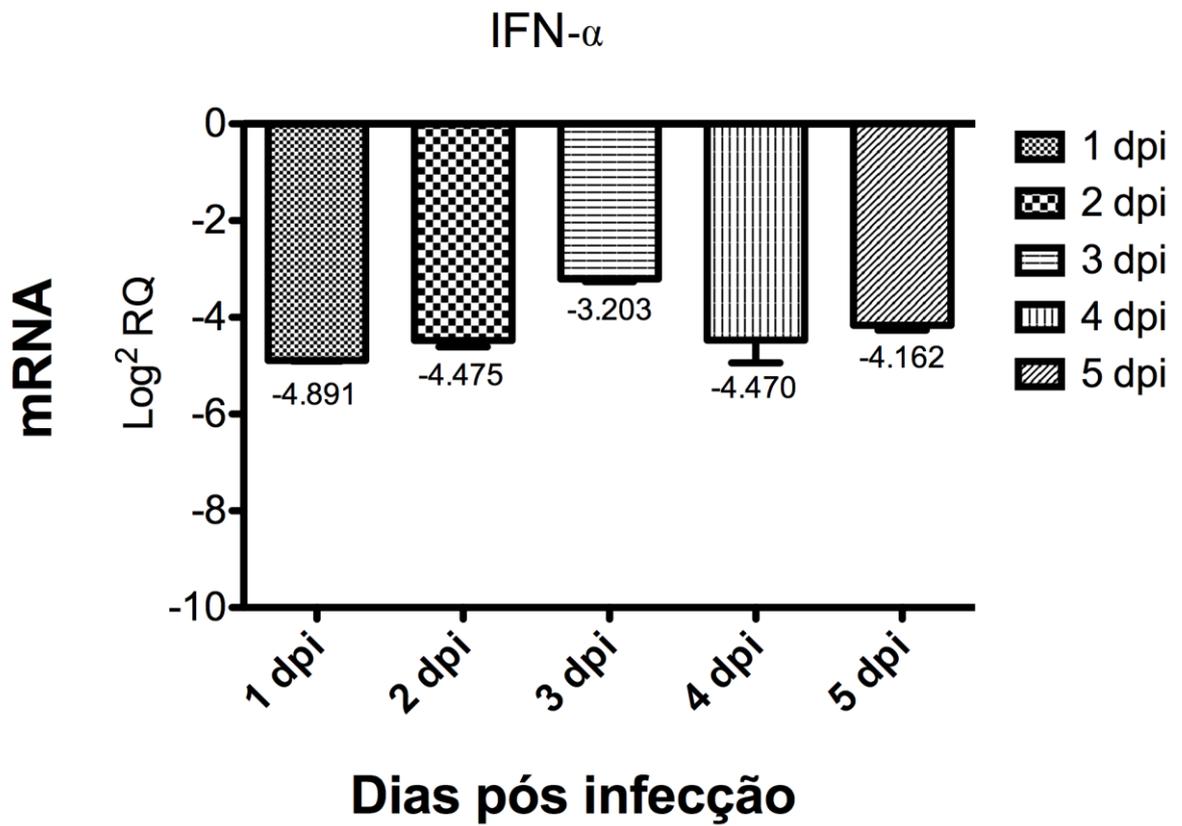


Figura 10. Padrão de expressão gênica do IFN- α nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.

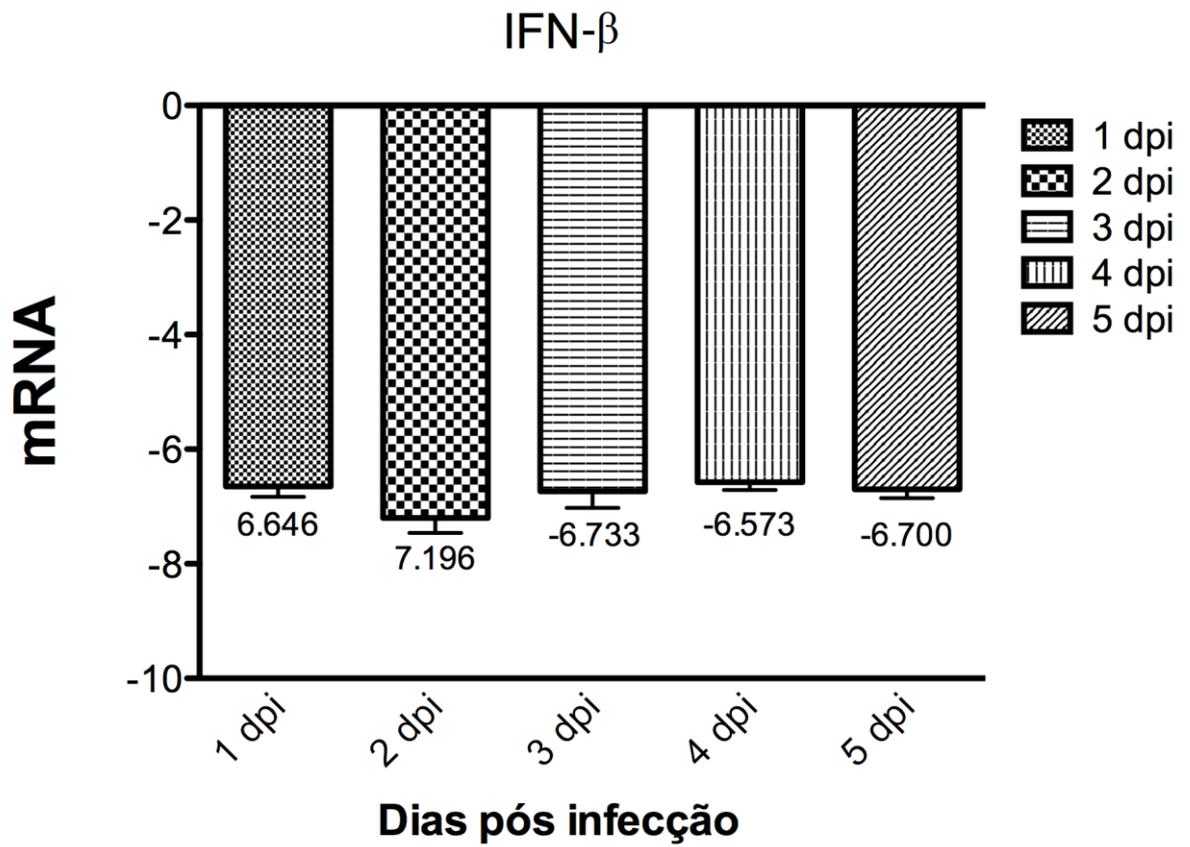


Figura 11. Padrão de expressão gênica do IFN- β nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.

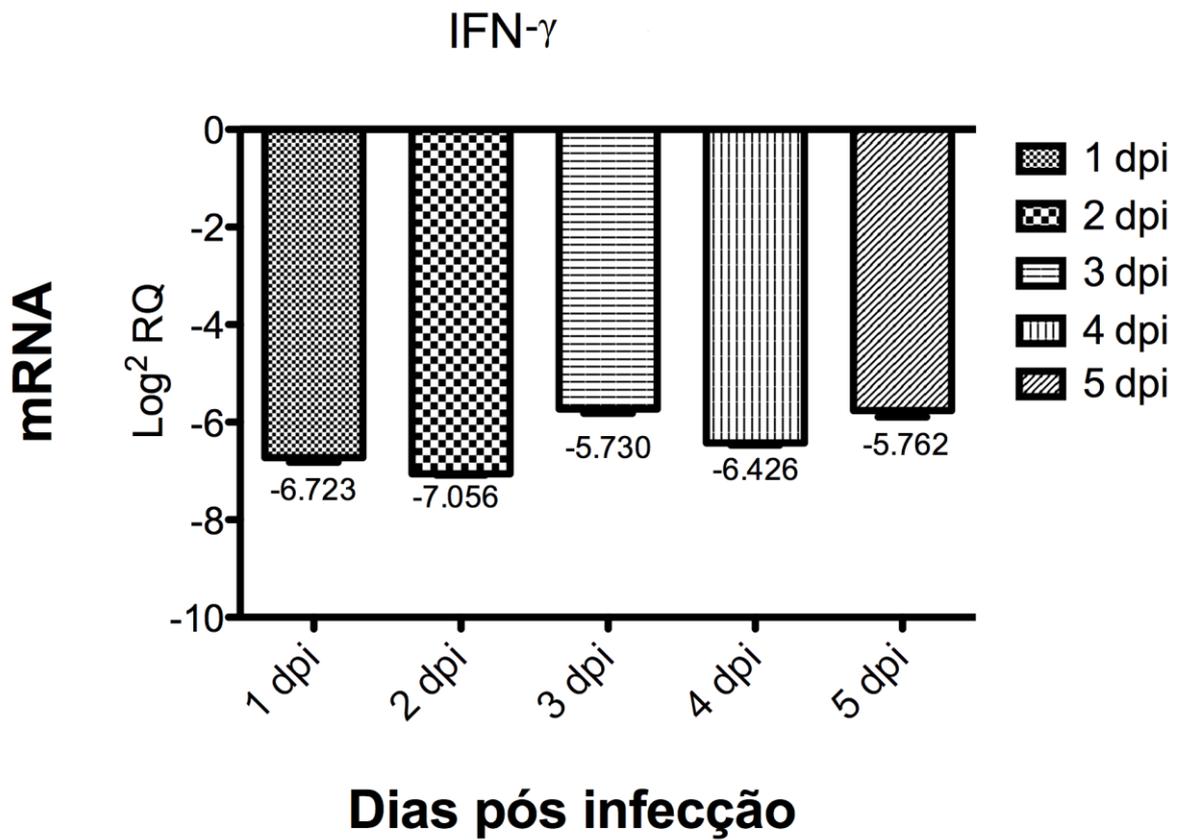


Figura 12. Padrão de expressão gênica do IFN- γ nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.

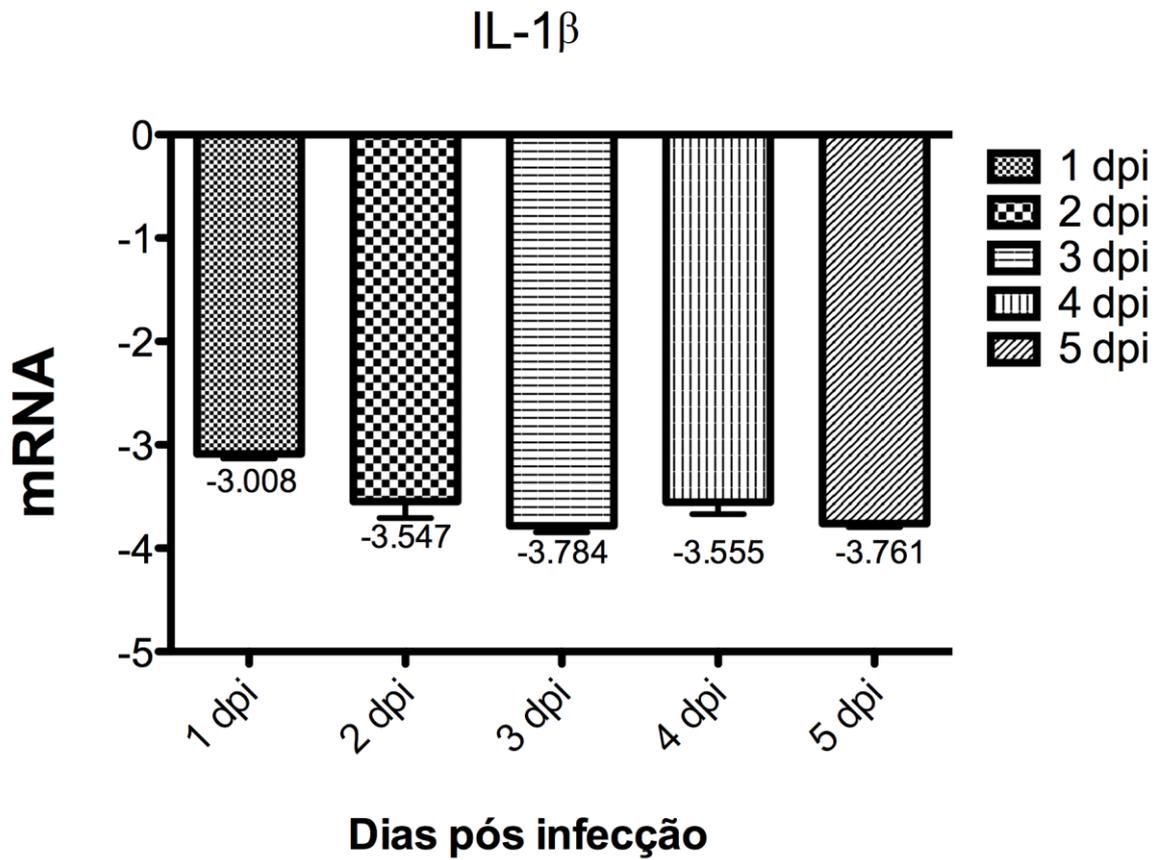


Figura 13. Padrão de expressão gênica da IL-1 β nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.

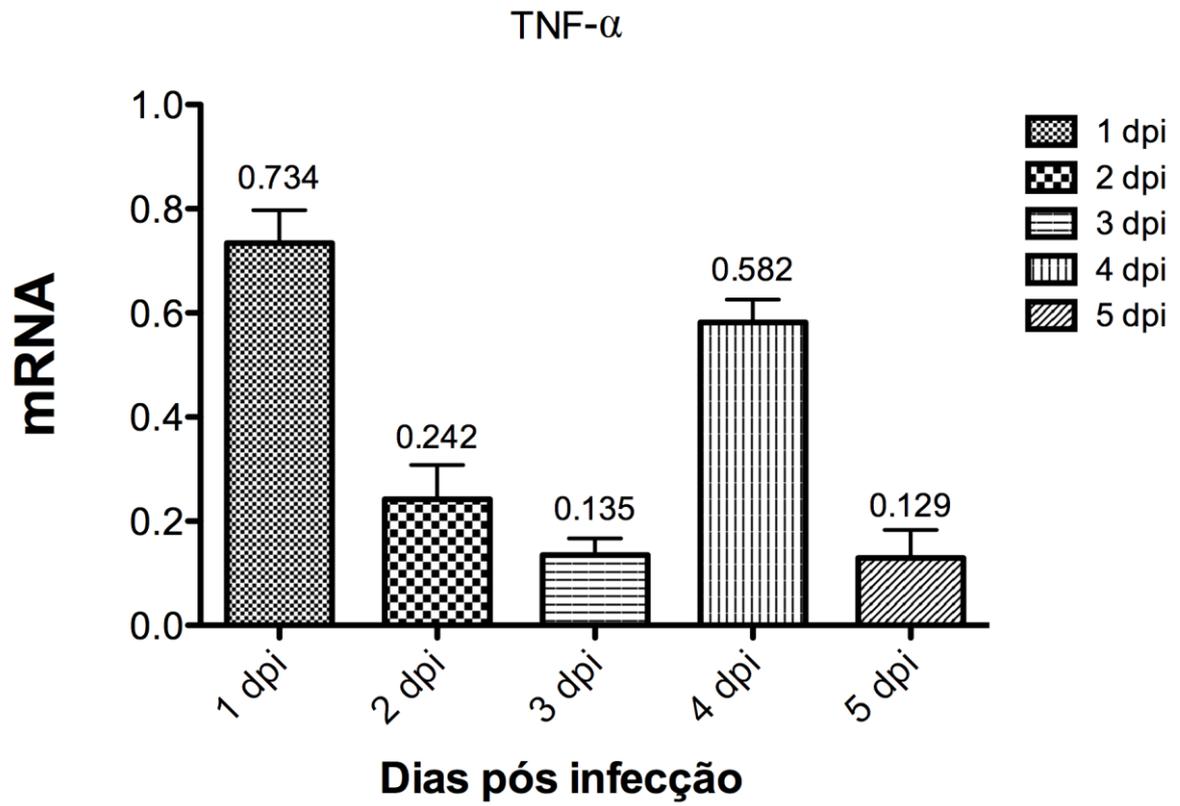


Figura 14. Padrão de expressão gênica do TNF- α nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.

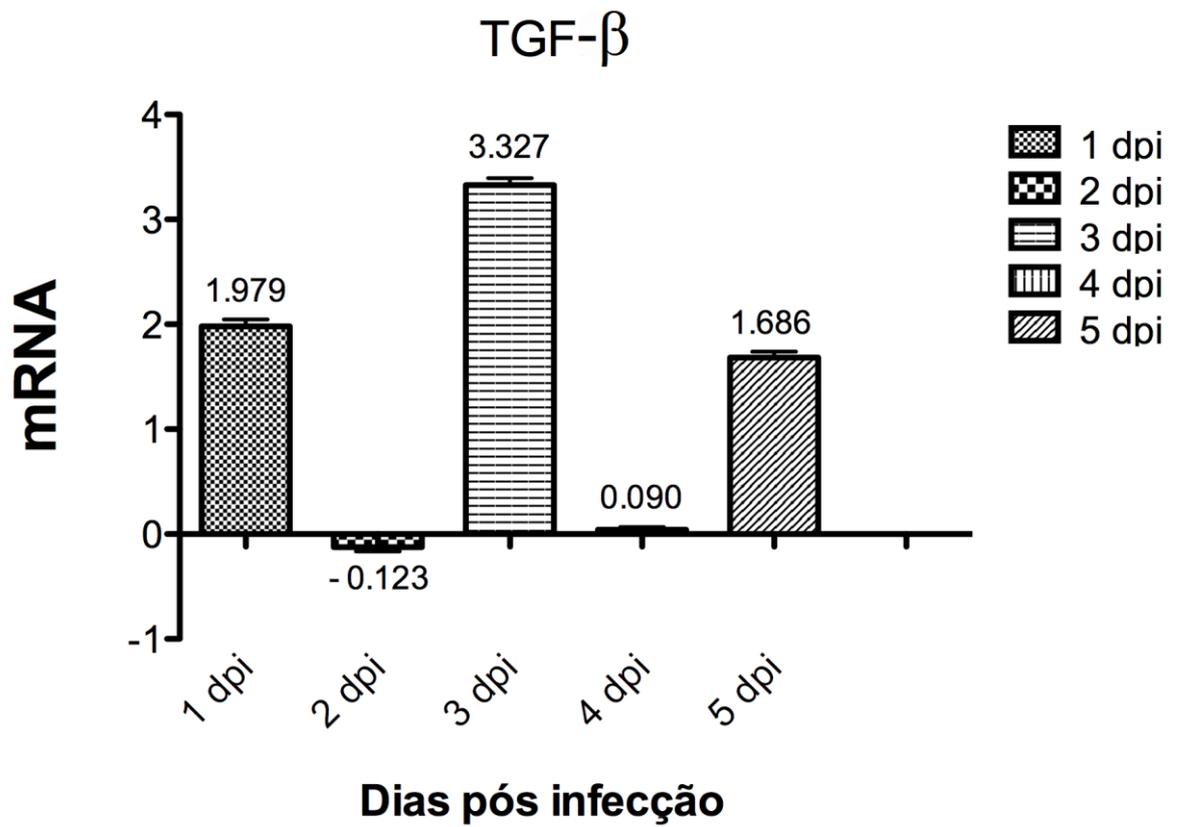


Figura 15. Padrão de expressão gênica do TGF- β nos cinco dias de infecção da cultura primária de células neurais com o VROC.

6 DISCUSSÃO

Os flavivírus encefalitogênicos VESL, VNO e VROC representam uma forte ameaça de ocorrência de surtos de encefalite no Brasil, sendo considerados potenciais causadores de crises na saúde pública. O VROC foi responsável por um abrupto surto de severa encefalite na região do Vale do Ribeira, SP, que surgiu e desapareceu inexplicavelmente. Portanto, o VROC levanta interesse no desenvolvimento de estudos que procurem melhor compreender a fisiopatologia da infecção por este agente, principalmente a sua evolução neurológica. Porém, até o momento, pouco conhecimento científico e epidemiológico relacionado ao VROC tem sido levantado. A respeito da pesquisa comportamental de células do SNC infectadas pelo VROC, os estudos experimentais de infecção com o VROC, desenvolvidos até o momento, utilizaram predominantemente modelos *in vivo*, mas ainda nenhum estudo utilizando protocolos de infecção de cultura primária de células do SNC com VROC foi desenvolvido. No presente estudo, um sistema de replicação do VROC infectando cultura primária de células neurais de camundongos neonatos e o padrão de expressão gênica de citocinas importantes na imunopatologia das encefalites flavivirais por estas células foi examinado.

O cultivo primário de células neurais é conveniente para estudos de infecção SNC por flavivírus, pois permite estudar o comportamento das respostas imunes presentes no SNC a nível celular e sem a interferência de componentes imunológicos da circulação sanguínea. Diversos protocolos para obtenção de culturas primárias de células do SNC já foram publicados, sendo capazes de provocar, segundo seus autores, padrões diferentes em termos de composição de neurônios e células da glia (Gao et al., 2002; Zhang et al., 2005; Martins-Filho, 2011; Ju et al., 2015). No presente estudo, o protocolo usado para obtenção de cultura primária de células neurais objetivou criar um sistema suficientemente representativo do SNC, isto é, contendo neurônios e células da glia. Obtiveram-se monocamadas celulares suficientemente densas e estabelecidas no sétimo dia de cultivo. A identificação do fenótipo celular por imunocitoquímica revelou uma composição celular heterogênea, apresentando os três tipos celulares presentes no SNC, neurônios, astrócitos e microglia (figura 6). Estes resultados corroboram com os padrões obtidos por Gao et al. (2002), Zhang et al. (2005), Martins-Filho (2011) e Ju et al. (2015), validando o paradigma deste estudo como modelo experimental *in vitro* para estudo de infecções do SNC.

No intuito de criar condições favoráveis tanto para a replicação viral quanto para o crescimento celular da cultura primária de células neurais, as células foram inoculadas com o VROC no sétimo dia de cultivo, quando a monocamada de células neurais apresentou-se

suficientemente densa e estabelecida. Levando-se em conta o neurotropismo do VROC, era esperada uma ampla permissividade das culturas primárias usadas neste estudo à infecção pelo VROC e, portanto, uma rápida destruição celular, prevista para morte completa das culturas em até no máximo quatro dias p.i., conforme demonstrado por Diniz et al., (2006) em infecções neuronais com o VNO. Interessantemente, as culturas inoculadas com o VROC apresentaram efeito citopatogênico e morte celular sutis, visualizados somente a partir do 2º dia p.i. (figura 7b), que se mantiveram constantes até o 5º dia p.i.. Só a partir do 6º dia p.i. a morte celular foi se acentuando e a monocamada de células foi se reduzindo progressivamente até a morte completa da cultura no 7º dia p.i. (figura 7c). Este perfil de morte celular de cultura primárias de células neurais corrobora com os achados de morte celular de cultura primária de células gliais infectada com o VEJ obtidos por Chen et al. (2004) e com os achados de morte celular de cultura de neuroblastoma humano infectada com o VNO obtidos por Kumar et al. (2010), indicando que os flavivírus encefalitogênicos geram perfis de morte celular similares em cultura de células neurais. As culturas tratadas como controle negativo permaneceram saudáveis por até seis dias, começando a apresentar sinais de morte celular e desintegração gradual da monocamada de células partir do 7º dia p.i. com morte completa da cultura no 10º dia p.i. Provavelmente, a morte das culturas tratadas como controle negativo tenha sido resultado do esgotamento de nutrientes do meio de cultivo ao qual foram mantidas, considerando-se que este meio não foi trocado após inoculação para garantir as mesmas condições as quais as culturas inoculadas pelo VROC foram submetidas.

A cinética de destruição de culturas celulares primárias, mediada por infecção viral, está diretamente associada à carga viral e à composição do inóculo usado em estudos experimentais bem como à natureza das interações vírus-célula hospedeira. Tratando-se do SNC, a capacidade de um vírus neurotrópico de infectar um determinado grupo celular depende de uma variedade de fatores inerentes tanto ao vírus quanto à célula hospedeira (Whitley & Gnann, 2002). Presume-se que a cinética de morte celular observada nas culturas primárias de células neurais inoculadas com o VROC no presente estudo seja resultado de vários fatores, que serão discutidos a seguir.

Primeiramente, o baixo MOI usado no estudo (1×10^6 vírions por poço que continham cerca de 5×10^5 células, fornecendo um MOI de 2 PFU/célula). Estudos experimentais demonstraram que inóculos com cargas virais elevadas tendem a favorecer a rápida destruição de culturas celulares enquanto cargas mais baixas tendem a prolongar o tempo de vida das culturas (Parquet et al., 2002; Diniz et al., 2006; Barros et al., 2009; George

et al., 2011). Também, de acordo com Gomes-Leal et al. (2006), o mecanismo de morte neuronal parece depender de fatores moleculares inerentes a região anatômica de origem das células e também do tipo de arbovírus infectante durante um quadro encefálico. As culturas primárias mistas utilizadas neste estudo foram derivadas de todo tecido encefálico de camundongos neonatos, portanto não foi possível associar o perfil de morte celular por infecção com VROC à região cerebral de origem das células.

Aspectos inerentes à particular fisiologia das células do SNC também devem ser levados em conta na cinética de morte da cultura primária. Tem sido proposto que infecções virais podem induzir morte de células infectadas tanto por necrose quanto por apoptose, ambas como consequência de resposta inflamatória (Julkunen et al., 2000; Rempel et al., 2004). Apoptose de células infectadas por flavivírus pode ocorrer tanto diretamente, como resultado da disseminação viral, quanto indiretamente, por intermédio de sensores celulares que iniciam a morte celular. Nestas circunstâncias, a morte apoptótica se comporta como um mecanismo da resposta imune inata (Everett & McFadden, 1999). No entanto, em infecções do SNC, as células neurais tem suas respostas imunes reguladas no intuito de preservar a integridade do tecido nervoso enquanto tentam eliminar o vírus, uma vez que danos neuronais severos podem causar prejuízos funcionais no hospedeiro (Griffin, 2003). Assim, os neurônios e muitas células gliais apresentam alta resistência à indução de apoptose, seja mediada pela replicação viral ou por células citotóxicas, provavelmente por causa da expressão de inibidores apoptóticos, como bcl-2, bcl-x e mcl-1, os quais podem ser ativados como mecanismo de proteção do tecido nervoso (Marten et al., 2000). Também, os neurônios apresentam regulação da expressão de interferons, que são responsáveis pela ativação das respostas antivirais nas células adjacentes (Massa et al., 1999). Ainda, tem sido proposto que os astrócitos, aparentemente, contribuem para a sobrevivência da cultura primária mista de células do SNC, pois são mais resistentes à infecção viral e, possivelmente, acarretam um quadro de infecção persistente. Diniz et al. (2006) observaram que em culturas primárias puras de neurônios infectadas pelo VNO, a morte celular foi muito mais acelerada em comparação às culturas primárias mistas (neurônios e astrócitos) infectadas pelo VNO. Também, Hussmann et al. (2013) observaram uma consistente redução na replicação do VNO em cultura primária de astrócitos em comparação à replicação em cultura primária de neurônios e células endoteliais do SNC, sugerindo que os astrócitos regulam a disseminação do VNO no SNC.

Em infecções por flavivírus, os neurônios são o alvo celular primário, enquanto as células da glia são infectadas em menor grau (Chen et al., 2004; Diniz et al., 2006; Daffis et

al., 2008). É válido ressaltar que os astrócitos e a microglia participam ativamente das respostas imunes do SNC. Sob condições de estímulo nocivo ou outras agressões ao SNC, os neurônios sinalizam as células gliais, provavelmente com a síntese de INF- γ e IL-6. Astrócitos e microglia ativados produzem um perfil de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a neurodegeneração (Kreutzberg, 1996; Neumann, 2001; Olson & Miller, 2004; Carpentier et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; So et al., 2006). Assim, maiores estudos que busquem investigar individualmente o papel de cada tipo celular do SNC durante infecções *in vitro* por flavivírus se fazem necessários. Deve-se considerar, ainda, a morte celular das culturas primárias inoculadas com o VROC como resultado do esgotamento de nutrientes do meio de cultivo, já que não houve troca de meio após inoculação viral para não interferir na carga viral presente nas culturas. Em comparação ao controle negativo, supõe-se que o esgotamento de nutrientes tenha ocorrido a partir do 6º dia p.i., o que pode ter contribuído para a rápida destruição celular observada no mesmo período da infecção.

A replicação do VROC na cultura primária de células neurais foi confirmada por imunocitoquímica para detecção de antígenos virais e pela titulação viral do meio de cultivo das culturas inoculadas com o VROC. Considerando-se o perfil de morte celular observado na cultura primária inoculada com o VROC, realizou-se o teste no 5º dia p.i., quando se supôs que a cultura estivesse completamente comprometida pela infecção viral. O padrão imunocitoquímico observado na figura 8 revela forte reatividade na detecção de antígenos do VROC em comparação ao controle negativo, demonstrando a permissividade das células neurais à infecção pelo VROC. No intuito de determinar quantitativamente a replicação viral do VROC na cultura primária infectada em função do período infeccioso, realizou-se a quantificação da carga viral pelo método da titulação viral em intervalos de 24 horas, durante os cinco primeiros dias do período infeccioso. Atribui-se este período de tempo levando-se em conta o perfil de morte celular observado na cultura primária inoculada com VROC. Procurou-se descartar a interferência do esgotamento de nutrientes, que possivelmente ocorreu a partir do 6º dia p.i., na morte celular e, portanto, na replicação viral.

Os resultados mostraram que o VROC se replica intensamente na cultura primária de células neurais nos dois primeiros dias de infecção, tendo no 1º dia p.i aumento de cerca de 2 vezes no título viral em relação ao inóculo, e no 2º dia p.i. um aumento de cerca de 10 vezes no título viral em relação ao 1º dia p.i.. No 3º e 4º dia p.i, houve redução de cerca de 10 vezes no título viral da cultura em relação ao dia anterior e no 5º dia p.i. houve redução em cerca de 70% na no título viral em relação ao dia anterior (figura 9). Esta cinética de replicação do

VROC foi similar aos resultados de cinética de replicação do VNO em cultura de células neurais obtidos por Marle et al. (2007) e Kumar et al. (2010). O padrão de replicação do VROC se relacionou com o padrão de morte das células neurais após a inoculação, em que se observou um decaimento da população de células a partir do 2º dia p.i., momento de maior título viral, o qual reduziu à medida que a população de células da cultura foi diminuindo.

Este padrão está de acordo com o proposto por Freshney (1994), que afirma que a cinética de replicação viral em cultura de células está diretamente relacionada à cinética de crescimento celular; durante a fase em que a quantidade de células mortas supera a de células vivas, ocorre comprometimento da disseminação viral, já que os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios. Deve-se considerar ainda a redução da replicação viral como consequência da resposta imune antiviral das células neurais submetidas à infecção, principalmente com a síntese de enzimas antivirais, como a 2'-5' oligoadenilato sintetase (Massa et al., 1999).

Considerando-se a permissividade das células neurais aos flavivírus e a participação delas na imunopatologia das encefalites causadas por flavivírus, e a modulação das respostas imunes sendo diretamente associadas à produção de citocinas, o presente estudo revelou, através da técnica de RT-qPCR do RNAm celular, o padrão de expressão gênica das citocinas INF- α , INF- β 1, INF- γ , TNF- α , IL-1 β e TGF- β (que reconhecidamente são produzidas por células neurais e desempenham atividade tanto neurotóxica quanto neuroprotetora) pelas células neurais primárias infectadas com o VROC durante os cinco primeiros dias de infecção com VROC em comparação as células neurais primárias não infectadas, tratadas como controle. O período de cinco dias foi atribuído em virtude do perfil cinético de morte das culturas primárias infectadas. A população de células apresentou-se altamente reduzida a partir do 6º dia p.i., o que forneceria uma quantidade de RNAm celular total significativamente inferior em relação aos dias anteriores e poderia comprometer a análise da expressão gênica.

Os resultados demonstraram que INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β apresentaram significativa redução na sua expressão gênica durante os cinco dias p.i., com uma taxa média de redução de, respectivamente, 4,24, 6,77, 6,34 e 3,53 vezes (figuras 10, 11, 12 e 13). Não foram observadas diferenças significativas na expressão destas citocinas entre os dias analisados, configurando um perfil constante de expressão gênica durante todo o período infeccioso. TNF- α apresentou sutil aumento na sua expressão durante os cinco dias p.i., mas não houve diferença significativa em relação ao controle (figura 14). TGF- β apresentou

aumento significativo na sua expressão no 1º, 3º e 5º p.i e alterações não significativas no 2º e 4º dia p.i. (figura 15). A taxa de aumento na expressão de TGF- β no 1º dia p.i. foi de quase 2 vezes, no 3º dia p.i. foi de 3,33 vezes e no 5º dia p.i foi de 1,69 vezes.

A investigação das respostas imunes do SNC frente às infecções por flavivírus tem sido amplamente desenvolvida, mas ainda muitos aspectos precisam ser desvendados, incluindo a expressão gênica de citocinas em modelos experimentais *in vitro*, que tem sido pouco estudada. Os padrões de expressão gênica observados no presente estudo divergem dos resultados de vários estudos desenvolvidos com infecção *in vitro* de células com flavivírus encefalitogênicos. Barros et al. (2009) observaram aumento significativo na síntese de INF- α por macrófagos 24 h p.i. com o VESL e 48h p.i. com o VROC, e não observaram alteração na expressão de IL-1 β , TNF- α and TGF- β por macrófagos infectados por VROC, VESL, VFA e VBUSQ. Kumar et al. (2010) observaram aumento significativo na síntese de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α por cultura de neuroblastoma humano 48h p.i. com o VNO. Qian et al. (2011) observaram aumento significativo na síntese de INF I por células dendríticas de sangue humano 48h p.i. com o VNO.

Hussmann et al. (2013) observaram aumento significativo na síntese de INF I em cultura primária de astrócitos humanos 48h p.i. com o VNO. Manocha et al. (2014), observaram aumento significativo na expressão gênica de INF- β por células da microglia humana 24h p.i. com o VEJ. Xie et al. (2015), não observaram alterações no padrão de expressão de INF I, IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α por monócitos e macrófagos humanos infectados por uma cepa selvagem do VNO, embora a infecção com uma cepa atenuada do VNO tenha aumentado a síntese de INF- β , IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α após 24h de infecção. Apenas o padrão de expressão de TNF- α obtido no presente estudo corrobora com os resultados de Barros et al. (2009) e Xie et al. (2015). Estes resultados indicam que o padrão de expressão gênica de citocinas em células infectadas por flavivírus encefalitogênicos é bastante variável e pode modificar conforme o tipo de infecção viral, o tipo de célula alvo, a carga viral do inóculo utilizado, a duração do processo infeccioso e a sinalização intercelular.

Outros estudos sobre infecção do SNC por flavivírus do complexo da Encefalite Japonesa, utilizando predominantemente modelos experimentais *in vivo*, incluindo análises de humanos, evidenciaram considerável aumento na síntese de citocinas, associadas à eliminação do vírus e à neurodegeneração, em tecido nervoso. Winter et al. (2004) observaram aumento significativo nos níveis de INF- α , IL-6 e IL-8 no líquido cefalorraquidiano de humanos acometidos de doença encefálica causada pelo VEJ, sendo o aumento mais expressivo em

indivíduos não sobreviventes. Não constataram diferença significativa nos níveis de INF- γ e óxido nítrico. Barros et al. (2011) observaram aumento significativo na expressão de citocinas do tipo Th1 e Th2 em amostras de tecido nervoso de camundongos infectados com o VROC. IL-1 β , INF- α , TNF- α e IL-4 apresentaram aumento a partir do 4º dia p.i., INF- γ apresentou aumento a partir do 2º dia p.i., e IL-10 e TGF- β apresentaram aumento a partir do 6º dia. Myint et al. (2014) observaram aumento significativo na expressão de INF- α e TNF- α em tecido cerebral de macacos infectados com o VEJ coletado de 10 a 13 dias p.i.. Kumar et al. (2014) observaram aumento significativo na expressão de IL-1 β , TNF- α e INF- γ em tecido nervoso de camundongos a partir do 8º dia p.i. com o VNO. No entanto, deve-se considerar que, em infecções do SNC, fundamentalmente, todas as células imunocompetentes infiltram no parênquima nervoso e produzem citocinas (Dorries, 2001; Diamond et al., 2003a, 2003b; Chang et al., 2000). Assim, estes estudos não puderam determinar a participação individual das células neurais na expressão das citocinas analisadas. Portanto, estudos futuros que busquem analisar o padrão de expressão gênica de citocinas intrínseco às células do SNC quando infectadas pelo VROC e outros flavivírus se fazem necessários.

Os INF I são os primeiros mediadores da resposta imune antiviral em células infectadas e células adjacentes. As células infectadas por flavivírus expressam INF I mediante diversas vias bioquímicas, que iniciam com o reconhecimento do RNA viral pelos receptores celulares (TLR3, TLR7 e RIG-1) e dirigem-se para a ativação de fatores de transcrição reguladores de interferon (IRFs), os quais incitam a transcrição dos genes dos INFs I (Hinds *et al.*, 2008; Rouse & Seherwat, 2010; Abbas et al., 2011). TLRs são amplamente expressos em células do SNC e efetivamente respondem aos flavivírus encefalitogênicos induzindo a expressão de INF I (Kreutzberg, 1996; Olson & Miller, 2004; Carpentier et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; So et al., 2006; Peltier et al., 2010; Carty et al., 2011; Xie et al., 2013). O INF- γ é produzido principalmente por células T, B e NK, tendo ação sinérgica aos INF I nas respostas imunes antivirais, mas sua atividade é essencialmente imunomoduladora (De-Maeyer & De-Maeyer-Guinard, 1992; De-Simone et al., 2015). Sabe-se que quando infectados, os neurônios sinalizam as células gliais adjacentes, provavelmente com a síntese de INF- β , INF- γ , IL-6, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez produzem um perfil de citocinas pró-inflamatórias que variam conforme o tipo de infecção viral, mas frequentemente incluem IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (Chang et al., 2000; Galeli et al., 2000; Neumann, 2001). Estas citocinas atuam induzindo a expressão de moléculas do MHC na superfície de células da microglia e aumentando a expressão de moléculas de adesão pelas

células endoteliais da barreira hematoencefálica, favorecendo o recrutamento de células inflamatórias (Middleton et al., 2002).

A expressão reduzida de INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β e aparentemente reduzida de TNF- α por células neurais primárias infectadas com o VROC observadas no presente estudo são achados novos que sugerem que a infecção pelo VROC (e possivelmente pelos flavivírus do complexo da Encefalite Japonesa) pode particularmente influenciar a maquinaria celular de transcrição gênica e interferir na secreção de moléculas imunomoduladoras. Nesse sentido, alguns aspectos inerentes à supressão gênica de citocinas em infecções do SNC, já descritos na literatura científica, podem ser considerados. O SNC apresenta acentuada regulação das respostas imunes no intuito de evitar a neurodegeneração (Griffin, 2003). A expressão de IL-1 β e TNF- α é previamente sinalizada pelos Interferons, INF- α , INF- β e INF- γ . É possível que uma baixa produção desses mediadores iniciais ocasionada pela infecção com o VROC tenha comprometido a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α . Destaca-se que neurônios infectados iniciam sua resposta imune com a produção preferencial de INF- β , que é menos neurotóxico em relação ao IFN- α (Akwa et al., 1998) e também produzem gangliosídeos que suprimem a atividade de NF- $\kappa\beta$ e outros fatores de transcrição associados à expressão de citocinas (Irani et al., 1996). Ainda, infecções da microglia aumentam a expressão de TRIM21 (uma proteína reguladora das vias de sinalização imunológica) e esse aumento gera redução na produção dos INF I (Manocha et al., 2014).

MicroRNAs (miRNA) produzidos no SNC, tais como miR-155 e miR-146a, notavelmente afetam as respostas imunes no SNC frente a infecção com flavivírus ao restringir a ação de IRFs e NF- $\kappa\beta$ e, com isso, reduzir a expressão de citocinas (Pareek et al., 2014; Zhang et al., 2015). Células microgliais em repouso podem ser ativadas, mediante infecção viral, em dois fenótipos: M1 e M2. O fenótipo M1 é pró-inflamatório e o M2 é anti-inflamatório, estando o M2 relacionado à redução na produção de citocinas (Salemi et al., 2011). Infecções do SNC ocasionam aumento na síntese de proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS), que são proteínas intracelulares inibidoras da sinalização citocina-mediada, incluindo vias dos Interferons e NF- $\kappa\beta$ (Steffensen et al., 2014). A diabetes mellitus tipo 2, uma doença metabólica que pode causar desordens cerebrovasculares (Seto et al., 2015), foi associada à redução na expressão de INF- α em ratos acometidos da doença e infectados com o VNO (Kumar et al., 2012). Portanto, estudos futuros investigando as características intrínsecas das células neurais quando infectadas pelo VROC e sua participação na regulação negativa da expressão de citocinas se fazem necessários.

O TGF- β está envolvido na regulação de numerosos processos celulares. No SNC é constantemente produzido por astrócitos e células da meninge, regulando a proliferação, diferenciação, ativação e apoptose de outras células, com o objetivo de gerar um balanço nas respostas imunes. O TGF- β interfere na expressão e na atividade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo INF- γ , IL-1, TNF- α e IL-2 (Fabry et al., 1995; Letterio & Roberts, 1998). No presente estudo, o aumento significativo na expressão gênica de TGF- β por células neurais primárias no 1º, 3º e 5º dia p.i. com o VROC concorda com a baixa expressão de INF- γ , IL-1 β e TNF- α , sugerindo que, neste modelo experimental, a regulação exercida pelo TGF- β predomina sobre as respostas antiviral e inflamatória. Assim, maiores estudos, os quais busquem avaliar o papel do TGF- β na regulação das respostas imunes em culturas de células infectadas com o VROC, fazem-se necessários.

7 CONCLUSÕES

- Cultura primária de células neurais demonstrou ser um bom modelo experimental *in vitro* para análise da infecção pelo flavivírus Rocio no SNC.
- O VROC foi capaz de infectar eficientemente a cultura primária de células neurais, ocasionando mudanças citopatogênicas a partir do 2º dia pós-infecção e morte completa da cultura no 7º dia p.i..
- O VROC se replicou ativamente na cultura primária de células neurais apresentando maior título viral no 2º dia p.i..
- A cinética de morte da cultura primária de células neurais mostrou uma relação direta com o padrão de replicação do VROC.
- A expressão gênica de INF- α , INF- β , INF- γ e IL-1 β pelas células neurais primárias infectadas pelo VROC apresentou-se significativamente reduzida a partir do 1ª dia p.i., mantendo um padrão de expressão constante até o 5º dia p.i..
- A expressão gênica de TNF- α pelas células neurais primárias infectadas com VROC não apresentou mudança significativa durante os cinco primeiros dias p.i..
- A expressão gênica de TGF- β pelas células neurais primárias infectadas pelo VROC apresentou aumento significativo no 1ª, 3º e 5º dia p.i..
- Pode-se sugerir que o VROC tem a capacidade de regular negativamente a expressão de citocinas moduladoras das respostas imunes antivirais e inflamatórias e que, neste modelo experimental, a imunorregulação exercida pelo TGF- β predomina sobre a modulação das respostas imunes antivirais e inflamatórias.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H.; PILLAI, S. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. Ed Elsevier. 7ª Edição. Rio de Janeiro, RJ, 2011, 592p.
- ADELMA, Z. N.; MILLER, D. M.; MYLES, K. M. Bed bugs and infectious disease: a case for the arboviruses. **PLoS Pathogens**, v. **9**, e1003462, 2013.
- AKWA, Y.; HASSETT, D. E., ELORANTA, M. L. et al. Transgenic expression of IFN- α in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. **Journal of Immunology**, v. **161**, p. 5013-5026, 1998.
- ALEYAS, A. G.; HAN, Y. W.; GEORGE, J. A.; KIM, B.; KIM, K.; LEE, C-K. et al. Multifront assault on antigen presentation by Japanese encephalitis virus subverts CD8+ T cell responses. **The Journal of Immunology**, v. **185**, p. 1429-1441, 2010.
- APPLER, K. K.; BROWN, A. N.; STEWART, B. S.; BEHR, M. J.; DEMAREST, V. L.; WONG, S. J.; BERNARD, K. A. Persistence of West Nile Virus in the central nervous system and periphery of mice. **PLoS ONE**, v. **5**, e10649, 2010.
- ARAÚJO, R.; PINHEIRO, F. P.; ARAÚJO, M. T.; DIAS, L. B. Patogenia das lesões hepáticas na infecção experimental com o Vírus Oropouche (Br na 19991): Análise comparativa das curvas virêmica e de infectividade com as alterações ultra-estruturais. **Hiléia Médica Belém**, v. **1**, p. 7-12, 1979.
- ASNIS, D. S.; CONETTA, R.; TEIXEIRA, A. A.; WALDMAN, G.; SAMPSON, B. A. The West Nile Virus outbreak of 1999 in New York: the flushing hospital experience. **Clinical Infectious Diseases**, v. **30**, n. 3, p. 413–8, 2000.
- AZEVEDO, R. S. S.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: FARHAT, C. K.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. **Infectologia Pediátrica**. Ed Atheneu. 3ª Edição. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2007. p. 533-551.
- BALE JR, J. F. Meningitis and Encephalitis. In: MCKENDALL, R. R. & STROOP, W. G., eds. **Handbook of Neurovirology**. Ed. Marcel Dekker. New York, 1994, p. 141-158.
- BALEOTII, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. **98**, n. 3, p. 379-382, 2003.
- 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São 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.; FIGUEIREDO, L. T. M. An Experimental Model of Meningoencephalomyelitis by Rocio Flavivirus in Balb/C Mice: Inflammatory Response, Cytokine Production, and Histopathology. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **85**, n. 2, p. 363-373, 2011.
- BEN-NATHAN, D.; HUITINGA, I.; LUSTIG, S.; VAN ROOIJEN, N.; KOLIBER, D. West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice. **Archives Virology**, v. **141**, p. 459-469, 1996.

- BISWAS, S. M.; AYACHIT, V. M.; SAPKAL, G. N.; MAHAMUNI, S. A.; GORE, M. M. Japanese encephalitis virus produces a CD4+ Th2 response and associated immunoprotection in an adoptive-transfer murine model. **Journal of General Virology**, v. **90**, p. 818-826, 2009.
- BODE, A. V.; SEJVAR, J. J.; PAPE, W. J.; CAMPBELL, G. L.; MARFIN, A. A. West Nile Virus disease: a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-country region of Colorado in 2003. **Clinical Infectious Diseases**, v. **42**, n. 9, p. 1234-1240, 2006.
- BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO, J. C.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A. E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER, L. West Nile Virus, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **13**, n. 4, p. 651-653, 2007.
- BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. *In*: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.(eds). **Fields Virology**, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, p.1043-1126.
- CARPENTIER, P. A.; BEGOLKA, W. S.; OLSON, J. K. ELHOFY, A.; KARPUS, W. J.; MILLER, S. D. Differential activation of astrocytes by innate and adaptative stimuli. **Glia**, v. **49**, p. 360-374, 2005.
- CARSON, P.J.; BORCHARDT, S. M.; CUSTER, B. et al. Neuroinvasive disease and west nile virus infection, North Dakota, USA, 1999-2008. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **18**, n. 4, p. 684-686, 2012.
- CARTY, M.; BOWIE, A. G. Evaluating the role of Toll-Like receptors in diseases of the central nervous system. **Biochemical Pharmacology**, v. **81**, p. 825-837, 2011.
- CASSEB, A. R.; CRUZ, A. V.; JESUS, I. S.; CHIANG, J. O.; MARTINS, L. C.; SILVA, S. P.; HENRIQUES, D. F.; CASSEB, L. M. N.; VASCONCELOS, P. F. C. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bulbalus bulbalis*) in Brazilian Amazon. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. **20**, n. 9, p. 1-3, 2014.
- CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. E.; THEILER, M. Isolation of St. Louis Encephalitis Virus From Arthropods in Pará, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **13**, p. 449, 1964.
- CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. **44**, p. 649-688, 1990.
- CHAMBERS, T. J.; DIAMOND, M. S. Pathogenesis of flavivirus encephalitis. **Advances in Virus Research**, v. **60**, p. 273-342, 2003.
- CHANCEY, C.; GRINEV, A.; VOLKOVA, E.; RIOS, M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. **Biomed Research International**, v. **2015**: 376230, 20p., 2015.
- CHANG, J. R.; ZACZYNSKA, E.; KATSETOS, C. D.; PLATSOUKAS, C. D.; OLESZAK, E. L. Differential expression of TGF- β , IL-2, and other cytokines in the CNS of Theiler's murine encephalomyelitis viru-infected susceptible and resistant strains of mice. **Virology**, v. **278**, p. 346-360, 2000.
- CHAVEZ, J. H.; FRANCA, R. F. O.; OLIVEIRA, C. J. F.; AQUINO, M. T. P.; FARIAS, K. J. S.; MACHADO, P. R. L.; OLIVEIRA, T. F. M.; FIGUEIREDO, L. T. M. et al.

- Influence of the CCR-5/MIP-1 α Axis in the Pathogenesis of Rocio Virus Encephalitis in a Mouse Model. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **89**, n. 5, p. 1013-1018, 2013.
- CHEN, C. J.; LIAO, S. L.; KUO, M. D.; WANG, Y.M. Astrocytic alteration induced by Japanese encephalitis virus infection. **Neuroreport**, v. **11**, p. 1933-1937, 2000.
- CHEN, C. J.; CHEN, J. H.; CHEN, S. Y.; LIAO, S. L.; RAUNG, S. L. Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection. **Journal of Virology**, v. **78**, p. 12107-12119, 2004.
- CHENG, Y.; KING, N. J. C.; KESSON, A. M. The role of tumor necrosis factor in modulating responses of murine embryo fibroblasts by flavivirus, West Nile. **Virology**, v. **329**, p. 361-370, 2004.
- CHU, J. J. H.; NG, M. L. The mechanism of cell death during West Nile virus infection is dependent on initial infectious dose. **Journal of General Virology**, v. **84**, p. 3305-3314, 2003.
- COIMBRA, T. L.; SANTOS, R. N.; PETRELLA, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; CASTRIGNANO, S. B.; SANTOS, C. L. Molecular characterization of two Rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in São Paulo State, Brazil and the development of a one-step rt-pcr assay for diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. **50**, n. 2, p. 89-94, 2008.
- CRUZ, A. C. R.; PRAZERES, A. S. C.; GAMA, E. C.; LIMA, M. F.; AZEVEDO, R. S. S.; CASSEB, L. M. N.; NUNES-NETO, J. P.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. **25**, n.11, p. 2517-2523, 2009.
- DAFFIS, S.; SAMUEL, M. A.; SUTHAR, M. S.; GALE, M. Jr; DIAMOND, M. S. Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. **Journal of Virology**, v. **82**, p. 10349-10358, 2008.
- DAVIS, L. E. Nervous system complications of systemic viral infections. *In*: AMINOFF, M. J. ed. **Neurology and General Medicine**. 2^a Edição. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 731-756.
- DE MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J. Interferon-gamma. **Current Opinion in Immunology**, v. **4**, p. 321-326, 1992.
- DE-SIMONE, F. I.; SARIYER, R.; OTALORA, Y-L.; YARANDI, S.; CRAIGIE, M.; GORDON, J.; SARIYER, I. K. INF-Gamma Inhibits JC Virus Replication in Glial Cells by Suppressing T-Antigen Expression. **PLoS ONE**, v. **10**, e0129694, 2015.
- DIAMOND, M. S. Evasion of innate and adaptative immunity by flaviviruses. **Immunology and Cell Biology**, v. **81**, p. 196-206, 2003.
- DIAMOND, M. S.; SHRESTHA, B.; MARRI, A.; MAHAN, D.; ENGLE, M. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. **Journal of Virology**, v. **77**, p. 2578-2586, 2003a.
- DIAMOND, M. S.; SITATI, E. M.; FRIEND, L. D.; HIGGS, S.; SHRESTHA, B.; ENGLE, M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. **198**, p. 1853-1862, 2003b.
- DIAMOND, M. S.; KLEIN, R. S. West Nile virus: Crossing the blood-brain barrier. **Nature**

- Medicine**, v. 10, p. 1294-1295, 2004.
- DINIZ, J. A. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; GUSMAN, H.; XU, F.; XIAO, S-Y.; POPOV, V. L.; VASCONCELOS, P. F. F.; TESH, R. B. West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: The role of astrocytes in chronic infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 691-696, 2006.
- DORRIES, R. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 253, p. 219-245, 2001.
- DOWD, K. A.; PIERSON, T. C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 306-315, 2011.
- DYE, C.; MERTENS, T.; HIRNSCHALL, G.; MPANJU-SHUMBUSHO, W.; NEWMAN, R. D.; RAVIGLIONE, M. C.; SAVIOLO, L.; NAKATANI, H. WHO and the future of disease control programmes. **Lancet**, v. 381, p. 413-418, 2013.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. Stockholm: ECDC, 2012.
- EVERETT, H.; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends in Microbiology**, v. 7, p.160-165, 1999.
- FABRY, Z.; TOPHAM, D. J.; FEE, D.; HERLEIN, J.; CARLINO J. A.; HART, M. N.; SRIRAM, S. TGF-beta 2 decrease migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. **Journal of Immunology**, v.155, p. 325-332, 1995.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILLOF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Family Flaviviridae. In: **Virus Taxinomy**. 8ª Edição. California: Elsevier Academic Press, 2005. p. 981-998.
- FERREIRA, I. B.; PEREIRA, L. E.; ROCCO, I. M.; MARTI, A. T.; SOUZA, L. T. M.; IVERSSON, L. B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil, I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. 36, n. 3, p. 265-274, 1994.
- FIGUEIREDO, L.T.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; FIORILLO, A. M. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da Região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 204-211, 1986.
- FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flavivirus. **Microbes and Infection, Paris**, v. 2, n. 9, p. 1643-1649, 2000.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Review on infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 955-961, 2014.
- FLIPSE, J.; SMIT, J. M. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. **PLoS Neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, e0003749, 2015.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique**. Ed. Wiley-Liss. 4ª Edição. Nova York, 1994. 397 p.

- GALELLI, A.; BALOUL, L.; LAFON, M. Abortive rabies virus central nervous infection is controlled by T lymphocyte local recruitment and induction of apoptosis. **Journal of Neurovirology**, v. **6**, p. 359-372, 2000.
- GAO, H. M.; HONG, J. S.; ZHANG, W.; LIU, B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. **22**, p. 782-790, 2002.
- GEORGE, S. K.; KAIZER, K. N.; BETZ, Y. M.; DHAR, A. K. Multiplication of Taura syndrome virus in primary hemocyte culture of shrimp (*Penaeus vannamei*). **Journal of Virological Methods**, v. **172**, p. 54-59, 2011.
- GERMAN, A. C.; MYINT, K. S. A.; MAI, N. T. H.; POMEROY, I.; PHU, N. H.; TZARTOS, J. et al. A preliminary neuropathological study of Japanese encephalitis in humans and a mouse model. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **100**, 1135-1145, 2006.
- GOMES-LEAL, W.; MARTINS, L. C.; DINIZ, J. A. P.; SANTOS, Z. A.; BORGES, J. A.; MACEDO, C. A. C.; MEDEIROS, A. C.; PAULA, L. S.; GUIMARÃES, J. S.; FREIRE, M. A. M.; VASCONCELOS, P. F. C.; PICANÇO-DINIZ, C. W. Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice. **Acta Tropica**, v. **97**, p. 126-139, 2006.
- GORDON, L. B.; NOLAN, S. C.; KSANDER, B. R.; KNOPF, P. M.; HARLING-BERG, C. J. Normal cerebrospinal fluid suppresses the *in vitro* development of cytotoxic T cells: role of the brain microenvironment in the CNS immune regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. **88**, p. 77-84, 1998.
- GRIFFIN, D. E. Arboviruses and the central nervous system. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. **17**, p. 121-132, 1995.
- GRIFFIN, D. E. Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. **Nature Reviews**, v. **3**, p. 493-502, 2003.
- HAYES, E. B.; KOMAR, N.; NASCI, R. S.; MONTGOMERY, S.P.; O'LEARY, D. R.; CAMPBELL, G. L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **11**, p. 1167-1173, 2005.
- HENRIQUES, D. F.; QUARESMA, J. A. S.; FUZII, H. T.; NUNES, M. R. T.; SILVA, E.V.P.; CARVALHO, V. L.; MARTINS, L. C.; CASSEB, S. M. M.; CHIANG, J. O.; VASCONCELOS, P. F. C. Persistence of experimental Rocio virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. **107**, p. 630-636, 2012.
- HINDS, L. B. A.; RUST, N. M.; SCOVINO, A. M. Resposta do hospedeiro às viroses. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Ed Guanabara Koogan. 2ª Edição. Rio de Janeiro, RJ, 2008. p. 59-82.
- HOTEZ, P. J.; ALVARADO, M.; BASÁÑEZ, M. G.; BOLLIGER, I.; BOURNE, R.; BOUSSINESQ, M.; BROOKER, S. J.; BROWN, A. S.; BUCKLE, G.; BUDKE, C. M. et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. **8**, n. 7, e2865, 2014.
- HUBÁLEK, Z.; HALOUZKA, J. West Nile Fever – A reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **5**, p. 643-650, 1999.
- HUSSMANN, K. L.; SAMUEL, M. A.; KIM, K. S.; DIAMOND, M. S.; FREDERICKSEN,

- B. L. Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes. **Journal of Virology**, v. **87**, p. 2814-2822, 2013.
- IRANI, D. N.; GRIFFIN, D. E. Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various states of infection. **Journal of Immunology**, v. **156**, p. 3850-3857, 1996.
- IVERSSON, L. B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**, v. **14**, n. 1, p. 9-35, 1980.
- IVERSSON, L. B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; ROSA, M. D. B. Ocorrência recente de infecção humana por arbovírus Rocio na região do Vale do Ribeira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. **31**, n. 1, p. 28-31, 1989.
- IVERSSON, L. B.; COIMBRA, T. L. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; MONATH, T. P. Use of immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay in the surveillance of Rocio encephalitis. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. **44**, n. 2/3, p. 164-166, 1992.
- IVERSSON, L. B.; TIRIBA, A. C. Encefalite por arbovírus Rocio. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. Ed. Atheneu, São Paulo, p. 233-239, 1996.
- JEAN, C. M.; HONARMAND, S.; LOUIE, J. K.; GLASER, C. A. Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **13**, n. 12, p. 1918-1920, 2007.
- JOHNSTON, L. J.; HALLIDAY, G. M.; KING, N. J. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. **114**, p. 560-568, 2000.
- JU, L.; ZENG, H.; CHEN, Y.; WU, Y.; WANG, B.; XU, Q. Dual Polarization of Microglia Isolated from Mixed Glial Cell Cultures. **Journal of Neuroscience Research**, 2015. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.23563/abstract>> acessos em 13 de jun. 2015. Epub 06-jun-2015. doi: 10.1002/jnr.23563.
- JULKUNEN, I.; MELEN, K.; NYQVIST, M.; PIHONEN, J.; SARENEVA, T.; MATIKAINEN, S. Inflammatory responses in influenza A virus infection. **Vaccine**, v. **19**, suppl. 1, p. 32-37, 2000.
- KAPOOR, H.; SIGNS, K.; SOMSEL, P.; DOWNES, F. P.; CLARK, P. A.; MASSEY, J. P. Persistence of West Nile Virus (WNV) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. **Journal of Clinical Virology**, v. **31**, p. 289-291, 2004.
- KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses and certain other viruses of vertebrates. 3ª Edição. San Antonio, USA. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985. 1141p.
- KIM, W. G.; MOHNEY, R. P.; WILSON, B.; JOHNSON, G. H.; LIU, B.; HONG, J. S. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **Journal of Neuroscience**, v. **20**, p. 6309-6313, 2000.
- KING, N.J.; SHRESTHA, B.; KESSON, A. M. Immune modulation by flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. **60**, p. 121-155, 2003.
- KING, N. J. C.; GETTS, D. R.; GETTS, M. T.; RANA, S.; SHRESTHA, B.; KESSON, A. M. Immunopathology of flavivirus infections. **Immunology and Cell Biology**, v. **85**, p. 33-42, 2007.

- KLEIBOEKER, S. B. West Nile Virus. *In*: NRIAGU, J. O. (ED). Encyclopedia of Environmental Health. **Elsevier, Burlington, Canada**, p. 761-768, 2011.
- KLENERMAN, P.; HILL, A. T cells and viral persistence: lesions from diverse infections. **Nature immunology**, v. **6**, n. 9, p. 873-879, 2005.
- KONG, K-F.; DELROUX, K.; WANG, X.; QIAN, F.; ARJONA, A.; MALAWISTA, S. E. et al. Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. **Journal of Virology**, v. **82**, p. 7613-7623, 2008.
- KREIL, T. R.; EIBL, M. M. Viral infection of macrophages profoundly alters requirements for induction of nitric oxide synthesis. **Virology**, v. **212**, p. 174-178, 1995.
- KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. **19**, p. 312-318, 1996.
- KUMAR, M.; VERMA, S.; NERURKAR, V. R. Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. **Journal of Neuroinflammation**, v. **7**: 73, 2010.
- KUMAR, M.; ROE, K.; NERURKAR, P. V.; NAMEKAR, M.; ORILLO, B.; VERMA, S.; NERURKAR, V. Impaired Virus Clearance, Compromised Immune Response and Increased Mortality in Type 2 Diabetic Mice Infected with West Nile Virus. **PLoS ONE**, v. **7**, e44682, 2012.
- KUMAR, M.; ROE, K.; NERURKAR, P. V.; ORILLO, B.; THOMPSON, K. S.; VERMA, S.; NERURKAR, V. R. Reduced immune cell infiltration and increased pro-inflammatory mediators in the brain of Type 2 diabetic mouse model infected with West Nile virus. **Journal of Neuroinflammation**, v. **11**: 80, 2014.
- KUNO, G.; CHANG, G. J. J.; TSUCHIYA, K. R.; KARABATSOS, N.; CROPP, C. B. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. **72**, n. 1, p. 72-83, 1998.
- LARENA, M.; REGNER M.; LEE, E.; LOBIGS, M. Pivotal role of antibody and subsidiary contribution of CD8+ T cells to recovery from infection in a murine model of Japanese encephalitis. **Journal of Virology**, v. **85**, p. 5446-5455, 2011.
- LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annual Review of Immunology**, v. **16**, p. 137-161, 1998.
- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections** v. **4**, n. 18, p. 1-5, 2015.
- LINDERBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular Biology of Flaviviruses. *In*: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P. The Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity. **Elsevier Academic Press, California**, 1. Ed. v. **60**, p. 23-47, 2003.
- LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.M.; SACCHETTA, L.A.; CALISHER, C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **American Journal of Epidemiology, Oxford**, v. **104**, n. 5, p. 444-449, 1978.
- LOPES, O.S.; SACCHETTA, L. A.; FRANCY, D. B.; JAKOB, W. L.; CALISHER, C. H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). **American Journal of Epidemiology, Oxford**, v. **113**, n. 2, p. 122-125, 1981.

- MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro**, v. **79**, n. 6, p. 647-664, 2004.
- MANOCHA, G. D.; MISHRA, R.; SHARMA, N.; KUMAWAT, K. L.; BASU, A.; SINGH, S. Regulatory role of TRIM21 in the type-I interferon pathway in Japanese encephalitis virus-infected human microglial cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. **11**: 24, 2014.
- MARLE, G V.; ANTONY, J.; OSTERMANN, H.; DUNHAM, C.; HUNT, T.; HALLIDAY, W. et al. West Nile virus-induced neuroinflammation: glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. **Journal of Virology**, v. **81**, p. 10933-10949, 2007.
- MARTEN, N. W.; STOHLMAN, S. A.; BERGMANN, C. C. Role of viral persistence in retaining CD8+ T cells within the central nervous system. **Journal of Virology**, v. **74**, p. 7903-7910, 2000.
- MARTINS-FILHO, A. J. Modelo *in vitro* de parkinsonismo experimental induzido por rotenona: investigação de mecanismos de ação, neuroproteção e morte celular. 2011. 142p. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, Belém.
- MASSA, P. T.; WHITNEY, L. W.; WU, C.; ROPKA, S. L.; JAROSINSKI, K. W. A mechanism for selective induction of 2'-5' oligoadenylate synthetase, anti-viral state, but not MHC class I genes by interferon- β in neurons. **Journal of Neurovirology**, v. **5**, p. 161-171, 1999.
- MATTAR, S.; EDWARDS, E.; LAGUADO, J.; GONZÁLEZ, M.; ALVAREZ, J.; KOMAR, N. West Nile Virus Antibodies in Colombian Horses. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **11**, n. 9, p. 1497-1498, 2005.
- MEDEIROS, D. B. A.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; CHANG, G. J.; KUNO, G. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. **The Journal of General Virology**, v. **88**, n. 8, p. 2237-2246, 2007.
- MIDDLETON, J.; PATTERSON, A. M.; GARDNER, L.; SCHMUTZ, C.; ASHTON, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. **Blood**, v. **100**, p. 3853-3560, 2002.
- MITCHELL, C. J.; FORATTINI, O. P.; MILLER, B. R. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. **20**, n. 3, p. 171-177, 1986.
- MONATH, T. P. & HEINZ, F. X. Flaviviruses. *In*: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. (ED). **Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, Pa**, p. 961-1034, 1996.
- MONDINI, A.; CARDEAL, I. L. S.; LÁZARO, E.; NUNES S. H.; MOREIRA, C. C.; RAHAL, P.; MAIA, I. L.; FRANCO, C.; GÓNGORA, D. V. N.; GÓNGORA- RUBIO, F.; CABRERA, E. M. S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, F. G.; BRONZONI, R. V. M.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M. L. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases, San Francisco**, v. **13**, n. 1, p. 176-178, 2007.
- MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. Ed. Rocca. São Paulo, 2007, 503p.

- MORALES, M. A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, J. B.; VISSANI, A.; TRONO, K.; GUTIERREZ, G.; PIGRETTI, S.; MENCHACA, H.; GARRIDO, N.; TAYLOR, N.; FERNANDEZ, F.; LEVIS, S.; ENRÍA, D. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. **12**, n. 10, p. 1559–1561, 2006.
- MYINT, K. S. A.; KIPAR, A.; JARMAN, R. G.; GIBBONS, R. V.; PERNG, G. C. et al. Neuropathogenesis of Japanese Encephalitis in a Primate Model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. **8**: e2980, 2014.
- NEUMANN, H. Control of glial immune function by neurons. **Glia**, v. **36**, p. 191-199, 2001.
- NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. **308**, p. 1314-1318, 2005.
- OLDSTONE, M. B. A. Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. **Virology**, v. **344**, p. 111-118, 2006.
- OLIPHANT, T.; ENGLE, M.; NYBAKKEN, G. E.; DOANE, C.; JOHNSON, S.; HUANG, L. et al. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. **Nature Medicine**, v. **11**, p. 522-530, 2005.
- OLSON, J. K.; MILLER, S. D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptative immune responses through multiple TLRs. **Journal of Immunology**, v. **173**, p. 3916-3924, 2004.
- OMALU, B. I.; SHAKIR, A. A.; WANG, G.; LIPKIN, W. I.; WILEY, C. A. Fatal fulminant pan-meningo-polioencephalitis due to West Nile virus. **Brain Pathology**, v. **13**, p. 465-472, 2003.
- OMETTO, T.; DURIGON, E. L.; ARAÚJO, J. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **107**, n.11, p. 723-730, 2013.
- PAREEK, S.; ROY, S.; KUMARI, B.; JAIN, P.; BANERJEE, A.; VRATI, S. mir-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. **Journal of Neuroinflammation**, v. **11**: 97, 2014.
- PARQUET, M. C.; KUMATORI, A.; HASEBE, F.; MATHENGE, E. G.; MORITA, K. St Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. **Archives of Virology**, v. **147**, n. 6, p. 1105-1119, 2002.
- PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M. A.; LEVIS, S. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **106**, n. 4, p. 467-474, 2011.
- PAUVOLID-CORRÊA, A.; CAMPOS, Z.; JULIANO, R.; VELEZ, J.; NOGUEIRA, R. M.; KOMAR, N. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. **8**, e2706, 2014.
- PELTIER, D. C.; SIMMS, A.; FARMER, J. R.; MILLER, D. J. Human neuronal cells possess functional cytoplasmic and TLR-mediated innate immune pathways influenced by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. **Journal of Immunology**, v. **184**, n. 12, p. 7010-7021, 2010.
- PETERSEN, L. R.; ROEHRIG, J. T. West Nile virus: a reemerging global pathogen.

- Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 7, n. 4, p. 611–4, 2001.
- PETERSEN, L. R.; HAYES, E. B. West Nile virus in the Americas. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1307-1322, 2008.
- PINHEIRO, F. P.; LECUC, J. W.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; LEITE, O. F. Isolation of St. Louis Encephalitis Virus From a Patient in Belém, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 145-148, 1981.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. Ed. Atheneu, São Paulo, p. 169-180, 1997.
- POGODINA, V. V.; BOCHKOVA, N. G.; LEVINA, L. S. Persistence of tick-borne encephalitis virus in monkeys. VII. Some features of the immune response. **Acta Virologica**, v. 28, p. 407-415, 1984.
- QIAN, F.; WANG, X.; ZHANG, L.; LIN, A.; ZHAO, H.; FIKRIG, E. et al. Impaired interferon signaling in dendritic cells from older donors infected in vitro with West Nile virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, p. 1415-1424, 2011.
- RAVI, V.; DESAI, A. S.; SHENOY, P. K.; SATISHCHANDRA, P.; CHANDRAMUKI, A.; GOURIE-DEVI, M. Persistence of Japanese encephalitis virus in the human nervous system. **Journal of Medical Virology**, v. 40, p.326-329, 1993.
- REMPEL, J. D.; MURRAY, S. J.; MEISNER, J.; BUCHMEIER, M. J. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. **Virology**, v. 318, p. 381-392, 2004.
- RIOS, M.; ZHANG, M. J.; GRINEV, A.; SRINIVASAN, K.; DANIEL, S.; WOOD, O. et al. Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. **Transfusion**, v. 46, p. 659-667, 2006.
- RODRIGUES, S. G.; OLIVA, O. P.; ARAUJO, F. A. A.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; HENRIQUES, D. F.; SILVA, E. V. P.; RODRIGUES, D. S. G.; PRAZERES, A. S. C.; TAVARES-NETO, J.; VASCONCELOS, P. F. C. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 81–86, 2010a.
- RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T.; CASSEB, S. M. M.; PRAZERES, A. S. C.; RODRIGUES, D. S. G.; SILVA, M. O.; CRUZ, A. C. R.; TAVARES-NETO, J. C.; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **The Journal of General Virology**, v. 91, n. 10, p. 2420–2427, 2010b.
- ROMANO-LIBER, N. S.; IVERSSON, L. B. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 236-242, 2000.
- ROSEMBERG, S. Neuropathology of S. Paulo South Coast Epidemic Encephalitis (Rocio Flavivirus). **Journal of the Neurological Sciences**, v. 45, p. 1-12, 1980.
- ROUSE, B. T.; SEHERWAT, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 514-526, 2010.
- SAEEDI, B. J.; GEISS, B. J. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and capping. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 4, n. 6, p. 723-735, 2013.

- SALEMI, J.; OBREGON, D. F.; COBB, A.; REED S.; SADIC, E.; JIN, J. FERNANDEZ, F.; TAN, J.; GIUNTA, B. Flipping the switches: CD40 and CD45 modulation of microglial activation states in HIV associated dementia (HAD). **Molecular Neurodegeneration**, v. **6**: 3, 2011.
- SAMUEL, M. A.; WANG, H.; SIDDHARTHAN, V.; MORREY, J. D.; DIAMOND, M. S. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. **104**, p. 17140-17145, 2007.
- SAXENA, S. K.; MATHUR, A.; SRIVASTAVA, R. C. Induction of nitric oxide synthase during Japanese encephalitis virus infection: evidence of protective role. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. **391**, p. 1-7, 2001.
- SETO, S. W.; YANG, G. Y.; H. K.; BENSOUSSAN, A.; KWAN, Y W.; CHANG, D. Diabetes Mellitus, Cognitive Impairment and Traditional Chinese Medicine. **International Journal of Endocrinology**, v. **2015**: 8010439, 2015.
- SHEN, J.; T-TO, S. S.; SCHRIEBER, L.; KING, N. J. Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. **Journal of Virology**, v. **71**, n. 12, p. 9323-9332, 1997.
- SHRESTHA, B.; DIAMOND, M. S. Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. **Journal of Virology**, v. **78**, p. 8312-8321, 2004.
- SILVA, J. R.; MEDEIROS, L. C.; REIS, V. P. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **108**, n. 7, p. 921-923, 2013.
- SMIT, J. M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, v. **3**, p. 160-171, 2011.
- SMITH, M. *et al* West Nile Virus activity – United States, January 1 – December 1, 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. **54**, n. 49, p. 1253-1256, 2005.
- SMITHBURN, K. C.; HUGHES, T. P.; BURKE, A. W.; PAUL, J.H. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **20**, p. 471-492, 1940.
- SO, E. Y.; KANG, M. H.; KIM, B. S. Induction of chemokine genes in astrocytes following infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus is mediated by the Toll-like receptor3. **Glia**, v. **53**, p. 858-567, 2006.
- SOARES, C. N.; CASTRO, M. J. C.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G.; PUCCIONI-SOHLER, M. Is west nile vírus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. **68**, n. 5, p. 761-763, 2010.
- STEFFENSEN, M. A.; FENGER, C.; CHRISTENSEN, J. E.; JORGENSEN, C. K.; BASSI, M. R.; CHRISTENSEN, J. P.; FINSEN, B.; THOMSEN, A. R. Suppressors of Cytokine Signaling 1 and 3 Are Upregulated in Brain Resident Cells in Response to Virus-Induced Inflammation of the Central Nervous System via at Least Two Distinctive Pathways. **Journal of Virology**, v. **88**, n. 24, p. 14090-14104, 2014.
- STEWART, B.S.; DEMAREST, V. L.; WONG, S. J.; GREEN, S.; BERNARD, K. A. Persistence of virus-specific immune responses in the central nervous system of mice after West Nile virus infection, **BMC Immunology**, v. **12**, p. 6, 2011.

- STRAATMANN, A.; SANTOS-TORRES, S.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; TAVARES-NETO, J. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 511-215, 1997.
- TESH, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, p. 1053-1059, 1979.
- TESH, R. B.; SIIRIN, M.; GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; XIAOYAB, W.; DUAN, T.; LEI, H.; NUNES, M. R.; XIAO, S.Y. Persistent West Nile infection in the golden hamster: studies on its mechanism and possible implications for other flavivirus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 2, p. 287-295, 2005.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; SHOPE R. E.; PINHEIRO, F. P. et al. Arbovirus research in the Brazilian amazon. *In*: UREN, M. F.; BLOK, J.; MANDERSON, L. H. Proceeding's fifth symposium on arbovírus research in Australia. p. 4-8, 1989.
- 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 host, and their pathology for man. *In*: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. **Instituto Evandro Chagas, Belém**, p.19-31. 1998.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P. F. C.; RODRIGUES, S. G.; CRUZ, A. C. R. Os Arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo. **Documento Técnico nº 2. Instituto Evandro Chagas/Fundação Nacional de Saúde, Belém**, 28p. 1994.
- TURTLE, L.; GRIFFITHS, M. J.; SOLOMON, T. Encephalitis caused by flaviviruses. **Q J Med**, v. 105, p. 219-223, 2012.
- VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 465-476, 1991.
- VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; PINHEIRO, F. P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, n. 2/3, p. 117-124, 1992.
- VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; SHOPE, R. E.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; RODRIGUES, S. G.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. *In*: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. **Instituto Evandro Chagas, Belém**, p.72-99, 1998.
- VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

- VASCONCELOS, P. F. C.; AZEVEDO, R. S. S.; RODRIGUES, S. G.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Arboviroses. *In*: LEÃO, R. N. Q.; BICHARA, C. N. C.; FHAHA-NETO, H.; VASCONCELOS, P. F. C. **Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia v. 1**. Ed Samauma. Belém, p. 481-503, 2013.
- VRIES, H. E. de; BLOM-ROOSEMALEN, M. C. M.; VAN OOSTEN, M.; BOER, A. G. de; VAN BERKEL, T. J. C.; BREIMER, D. D.; KUIPER, J. The influence of cytokines on the integrity of blood-brain barrier *in vitro*. **Journal of Neuroimmunology**, v. **64**, p. 37-43, 1996.
- WAN, S. W.; LIN, C. F.; WANG, S.; CHEN, Y. H.; YEH, T. M.; LIU, H. S. et al. Current progress in dengue vaccines. **Journal of Biomedical Science**, v. **20**, n. 37, p. 1-9, 2013.
- WANG, Y.; LOBIGS, M.; LEE, E.; MÜLLBACHER, A. CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. **Journal of Virology**, v. **77**, p. 13323-13334, 2003.
- WANG, T.; TOWN, T.; ALEXOPOULOU, L.; ANDERSON, J. F.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R. A. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into brain causing lethal encephalitis. **Nature Medicine**, v. **10**, p. 1366-1373, 2004.
- WHITLEY, R. J.; GNANN, J. W. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. **Lancet**, v. **359**, p. 507-513, 2002.
- WINTER, P. M.; DUNG, N. M.; LOAN, H. T.; KNEEN, R.; WILLS, B.; THU, L. T.; HOUSE, D. et al. Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Humans with Japanese Encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. **190**, p. 1618-1626, 2004.
- XIE, G.; WELT, T.; WANG, J.; WHITEMAN, M. C.; WICKER, J. A.; SAXENA, V. et al. A West Nile virus NS4B-P38G mutant strain induces adaptive immunity via TLR7-MyD88-dependent and independent signaling pathways. **Vaccine**, v. **31**, p. 4143-4151, 2013.
- XIE, G.; LUO, H.; TIAN, B.; MANN, B.; BAO, X.; MCBRIDE, J.; TESH, R.; BARRETT, A. D.; WANG, T. A West Nile virus NS4B-P38G mutant strain induces cell intrinsic innate cytokine responses in human monocytic and macrophage cells. **Vaccine**, v. **33**, p. 869-878, 2015.
- YE, C.; ABRAHAM, S.; WU, H.; SHANKAR, P.; MANJUNATH, N. Silencing early viral replication in macrophages and dendritic cells effectively suppresses flavivirus encephalitis. **PLoS One**, v. **6**, e17889, 2011.
- ZHANG, W.; WANG, T.; PEI, Z.; MILLER, D. S.; WU, X.; BLOCK, M. L.; WILSON, B.; ZHANG, W.; ZHOU, Y.; HONG, J. S.; ZHANG, J. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, v. **19**, p. 533-542, 2005.
- ZHANG, Y.; JING, J.; XINFENG, L. WANG, J.; FENG, X.; CAO, R.; CHEN, P. Integration analysis of miRNA and mRNA expression profiles in swine testis cells infected with Japanese encephalitis virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. **32**, p. 342-347, 2015.

ANEXO 1

Cópia do parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IEC).

CEUA



CERTIFICADO nº 18/2015

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação de citocinas envolvidas em infecções neurais causadas pelo vírus Rocio**”, protocolo nº **021/2014**, sob a responsabilidade de **Edna Cristina Santos Franco**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

Vigência do Projeto	01/08/2014 a 31/07/2016				
Espécie / linhagem	Camundongo Isogênico Balb/c				
Sexo	Fêmeas				
Nº de animais	12	e	43	=	Total 55
Peso	10g	e	02g		
Idade	16-18 dias de gestação	e	01- 04 dias		
Origem	Biotério/IEC				

De acordo com Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 29 de junho de 2015.

Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS

Thiago Vasconcelos dos Santos
Vice Coordenador da CEUA

ANEXO 2

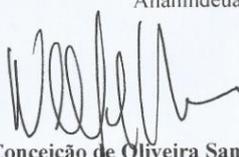
Cópia do memorando que autoriza a utilização da amostra do vírus Rocio (SP H 34675) proveniente do acervo de isolados virais da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC).

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a utilização de amostras liofilizadas do vírus Rocio (H34675) pertencentes ao acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas deste instituto a fim de desenvolver o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS ENVOLVIDAS EM INFECÇÕES NEURAIS CAUSADAS PELO VÍRUS ROCIO" a ser desenvolvido pelo mestrando Adriano da Paixão Souto orientando da Dra. Edna Cristina Santos Franco.

Ademais, acrescentamos que atenda todas as recomendações ou orientações complementares solicitadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto.

Ananindeua- PA, 14 de janeiro de 2014



Elizabeth Conceição de Oliveira Santos

Diretora do Instituto Evandro Chagas

Secretaria de Vigilância em Saúde/MS

Wyller Alencar de Mello

Substituto Eventual da Diretoria
Instituto Evandro Chagas / SVS/MS