



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS

Daniele Freitas Henriques

**INFECÇÃO PERSISTENTE PELOS FLAVIVÍRUS ILHÉUS E
ROCIO EM HAMSTERS DOURADOS JOVENS
(*MESOCRICETUS AURATUS*)**

Belém-PA

2009

DANIELE FREITAS HENRIQUES

**INFECÇÃO PERSISTENTE PELOS FLAVIVÍRUS ILHÉUS E ROCIO EM
HAMSTERS DOURADOS JOVENS (*MESOCRICETUS AURATUS*)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Doença Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

BELÉM-PA

2009

DANIELE FREITAS HENRIQUES

**INFECÇÃO PERSISTENTE PELOS FLAVIVÍRUS ILHÉUS E ROCIO EM
HAMSTERS DOURADOS JOVENS (*MESOCRICETUS AURATUS*)**

Dissertação apresentada à aprovação como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Banca Examinadora:

Membro Titular Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma
Departamento de Patologia, UFPA

Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Dra. Conceição de Maria Almeida Vieira
Departamento de Medicina Veterinária, UFPA

Membro Suplente Dra. Elizabeth Salbé T. da Rosa
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Belém, 28 de agosto de 2009.

EPIÍGRAFE

“Aplausos, quando os não fundamentam o mérito, afagam certamente a alma e dão algum verniz de celebridade. Mas quem tem vontade e quer fazer, prefere a lição que melhora ao ruído que lisonjeia”.

Machado de Assis

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais
Fernando e Laura, que com toda a fé
depositada nos meus esforços, me
ensinaram a ter fé e acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter guiado a minha vida, encontrando sempre pessoas que me ajudaram e ensinaram muito.

Aos meus pais Laura e Fernando, pelo amor e apoio incondicional, divido essa conquista com vocês. Obrigada pelo exemplo de vida, força, caráter, união e principalmente de amor. Amo vocês!

Aos meus irmãos Junior, Vinicius e Marcelo por serem o meu porto seguro, pelo apoio e incentivo em todas as fases da minha vida. Amor e generosidade são as palavras que definem a nossa relação.

Ao meu amado avô João Batista por fazer parte constante da minha educação, por ser um exemplo de ética profissional para mim, por sua generosidade e amor empregados à nossa família.

À minha querida avó Laurinda pela dedicação, mostrando-se sempre interessada e atenciosa com o meu trabalho.

Aos meus primos Tatiana, Danilo e Laís, que tiveram uma participação fundamental nessa conquista, estando sempre presentes, incansáveis ao longo desses cinco anos.

Aos meus tios Eliane e Sérgio, pela amizade. Serei grata sempre, mesmo morando distante permaneceram próximos.

Aos meus tios Edmundo Palaia e Ana Lúcia, aos meus primos Nathália, Amanda e Luiz Gregório. Sem a generosidade de vocês não teria sido possível alcançar esse objetivo.

A todos os meus tios e primos pelo incentivo, pela formação pessoal e pelo apoio.

Ao meu orientador Dr. Pedro Vasconcelos, pela oportunidade de aprendizado e principalmente pela confiança.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo incentivo à pesquisa.

Às amigas Jannifer Chiang e Livia Caricio pela amizade, pela orientação profissional, pela paciência e confiança. À vocês, queridas amigas, minha total admiração.

Aos amigos Milene Silveira, Basílio Buna, Geraldo Mendes pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela convivência maravilhosa.

Ao Dr. Juarez Quaresma pela paciência e participação na realização da histopatologia e imunohistoquímica.

À Dra. Hellen Fuzzi pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Eliana Pinto pela colaboração no desenvolvimento das técnicas de cultura de célula.

Ao Samir Casseb pela participação na realização das técnicas de biologia molecular e pela atenção despendida neste trabalho.

Aos amigos Daniele Medeiros, Valéria Carvalho, Creuza Carvalho, Gregório Dias, pela amizade, pelas orações, pelo incentivo, pela colaboração a este trabalho.

À equipe da Biblioteca/IEC, que viabilizou a aquisição de diversas fontes bibliográficas.

A todos os colegas da Seção de Arbovírus/IEC, que direta ou indiretamente possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Naisha Cardoso, Mayana Amaro, Amanda Veloso, Larissa Tamanqueira, Roberta Amanajás, Karla Pamplona, Yedda Laiun, Luiza Soares, Felipe Sequeira, Manoel Cardoso, Bruno Andrade, Alexandre Bastos, Rafael da Conceição, Éder Pisco, Fabiano Barbalho, Fábio Hage, José Augusto, Anna Carolina Lopes e Marcela Bianco pelo companheirismo, amizade, paciência, por ser junto com seus familiares a minha família nesses anos, companhias em todos os momentos. Pelas palavras de incentivo e perseverança, ao longo de todas as dificuldades enfrentadas durante a elaboração deste trabalho.

À Universidade Federal do Pará, ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical pelos conhecimentos adquiridos.

À FAPESPA pelo apoio financeiro durante o período referente ao curso de mestrado realizado na UFPA.

SUMÁRIO

	Página
EPÍGRAFE.....	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i> , GÊNERO <i>FLAVIVÍRUS</i>	01
1.1.1 Características Físico-químicas e Replicação dos flavivírus.....	02
1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS FLAVIVÍRUS.....	05
1.2.1 Flavivírus Hemorrágicos.....	06
1.2.2 Flavivírus Encefalitogênicos	07
1.3 FLAVIVÍRUS ESTUDADOS.....	10
1.3.1 <i>Virus Ilheus</i>.....	10
1.3.2 <i>Virus Rocio</i>.....	11
1.4 ANATOMIA PATOLÓGICA DOS FLAVIVIRUS ENCEFALITOGÊNICOS..	13
1.5 INFECÇÃO PERSISTENTE.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 GERAL.....	22

3.2. ESPECÍFICOS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 AMOSTRAS E ESTOQUE VIRAL.....	23
4.2 TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS.....	24
4.3 PRODUÇÃO DOS SOROS HOMÓLOGOS.....	25
4.4 CINÉTICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS DOURADOS.....	25
4.5 DETECÇÃO DE ANTICORPOS.....	26
4.5.1 Inibição da Hemaglutinação (IH).....	26
4.6 REPLICAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS VERO.....	28
4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	29
4.8 CURVA VIRÊMICA.....	31
4.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	33
4.10 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS POR IMUNOHISTOQUÍMICA....	33
5 RESULTADOS.....	35
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL.....	35
5.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO..	35
5.3 ISOLAMENTO VIRAL EM CÉLULAS VERO.....	37
5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	40
5.5 CURVA VIRÊMICA.....	43
5.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E DETECÇÃO ANTIGÊNICA.....	48
5.6.1 Caracterização das alterações Imuno-histopatológicas observadas na infecção pelo VROC.....	48
5.6.2 Semiquantificação das lesões teciduais e detecção antigênica	

na infecção pelo VROC.....	55
5.6.3 Caracterização das alterações Imuno-histopatológicas observadas na infecção pelo VILH.....	58
5.6.4 Semiquantificação das lesões teciduais e detecção antigênica na infecção pelo VILH.....	62
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÕES.....	78
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	97

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema da estrutura dos <i>Flavivirus</i> : vírus imaturo e vírus maduro.....	3
Figura 2. Esquema da organização do genoma dos <i>Flavivirus</i>	4
Figura 3. Inoculação por via i.c. em camundongo albino suíço recém-nascido.....	24
Figura 4. Esquema do teste de Inibição da Hemaglutinação.....	28
Figura 5. Esquema do teste de Imunofluorescência Indireta.....	31
Figura 6 A. Níveis de anticorpos específicos para o VROC	36
Figura 6 B. Níveis de anticorpos específicos para o VILH.....	37
Figura 7. Cultura de células VERO mostrando ECP.....	39
Figura 8. Imunofluorescência Indireta de células VERO infectadas com os VROC e VILH	42
Figura 9. Curva de Dissociação dos VROC e VILH.....	43
Figura 10. Curva Padrão dos VROC e VILH.....	44
Figura 11 A e B. Carga viral do VROC no fígado e cérebro em PFU/mL.....	45
Figura 11 C. Carga viral do VROC no sangue em PFU/mL.....	46
Figura 12 A e B. Carga viral do VILH no fígado e cérebro em PFU/mL.....	47
Figura 12 C. Carga viral do VILH no sangue em PFU/mL.....	48

Figura 13. Micrografia por HE de hamsters infectados com o VROC (tecidos: hepático,renal e pulmonar).....	52
Figura 14. Micrografia por HE de hamsters infectados com o VROC (tecido nervoso).....	53
Figura 15. Fotomicrografia da análise imunohistoquímica de órgãos de hamsters dourados infectados com o VROC.....	54
Figura 16. Semiquantificação das alterações do fígado na infecção pelo VROC.....	56
Figura 17. Semiquantificação das alterações do tecido renal, na infecção pelo VROC.....	57
Figura 18. Semiquantificação das alterações do tecido nervoso, na infecção pelo VROC.....	57
Figura 19. Micrografia por HE de hamsters infectados com o VILH (tecidos: hepático, pulmonar e nervoso	61
Figura 20. Fotomicrografia da análise imunohistoquímica de órgãos de hamsters dourados infectados com o VILH.....	62
Figura 21. Semiquantificação das alterações do tecido hepático, na infecção pelo VILH.....	64
Figura 22. Semiquantificação das alterações do tecido renal, na infecção pelo VILH.....	64
Figura 23. Semiquantificação das alterações do tecido nervoso, na infecção pelo VROC.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Modelo de Iniciadores específicos utilizados para os VROC e VILH.....	32
Quadro 2: Título de Anticorpos IH no soro de hamsters.....	36
Quadro 3: Amostras coletadas durante a cinética do VROC que produziram ECP em célula VERO.....	38
Quadro 4: Amostras coletadas durante a cinética do VILH que produziram ECP em célula VERO.....	38
Quadro 5: Título do VROC, conforme a porcentagem de antígenos virais observado.....	41
Quadro 6: Título do VILH, conforme a porcentagem de antígenos virais observado.....	41

RESUMO

Os arbovírus Ilhéus (VILH) e Rocio (VROC) são flavivirus (família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*) de grande importância para a saúde pública no Brasil por estar relacionados a casos de encefalites em humanos. Sabe-se que outros flavivírus estão envolvidos com a infecção persistente *in vitro*, *in vivo* e em relatos clínicos. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi investigar a possível ocorrência de infecção persistente *in vivo* dos VILH e VROC utilizando hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental. Os hamsters foram inoculados com suspensão de cérebros de camundongos recém-nascidos infectados com títulos de 9,8 e 9,6 DL₅₀/0,02 mL do VROC e VILH respectivamente, pela via intraperitoneal, sendo em seguida a intervalos pré-determinados, anestesiados e sacrificados para coleta de amostras de sangue, soro, urina e órgãos durante quatro meses (120 dias) pós-inoculação (p.i.). A quantificação viral foi calculada em amostras de cérebro, fígado e sangue, pela técnica de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR). Todas as amostras coletadas foram inoculadas em célula VERO para confirmação de replicação viral, sendo detectados antígenos virais pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), os níveis de anticorpos foram determinados pelo teste de inibição da hemaglutinação. Exame histopatológico por hematoxilina-eosina e detecção de antígenos virais por imunohisquímica foram avaliados nas amostras de vísceras e encéfalos coletados durante a cinética. O estudo demonstrou que hamsters dourados jovens constituem um bom modelo experimental para infecção persistente pelos flavivírus VILH e VROC. Os dois vírus induziram uma forte resposta imune, embora os níveis de anticorpos para o VILH tenham sido maior do que para o VROC; já o VROC mostrou-se mais patogênico nestes animais,

sugerindo uma capacidade de neurovirulência maior que o VILH. Das amostras coletadas dos hamsters infectados e inoculadas em células VERO foi possível isolar ambos os vírus a partir de todos os órgãos, sangue, soro e urina, sendo confirmada a replicação viral por IFI. Quanto à infecção persistente, o VROC foi detectado, pela técnica de qRT-PCR, por três meses p.i., no cérebro, fígado e sangue, enquanto o VILH apresentou persistência viral apenas no cérebro durante 30 dias p.i. por qRT-PCR. O VROC foi capaz de produzir alterações histopatológicas e células imunomarcadas expressando antígenos virais nas amostras de fígado, rim, pulmão e cérebro por quatro meses. Ao passo que para o VILH, as alterações histopatológicas e a expressão de antígenos virais nas amostras de fígado, rim e pulmão ocorreram por 30 dias p.i.; e no cérebro por quatro meses p.i.; Os achados deste estudo demonstraram que ambos os vírus apresentaram capacidade de causar infecção persistente em hamsters infectados por via periférica, sendo necessários mais estudos para determinar os mecanismos fisiopatológicos e a patogênese de estabelecimento dessas infecções persistentes.

Palavras Chave: Infecção persistente, Flavivírus, *Vírus Rocio* e *Vírus Ilhéus*.

ABSTRACT

Ilheus (ILHV) and Rocio (ROCV) are flaviviruses (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) of great importance to public health in Brazil because these viruses are associated to encephalitis cases in humans. Recent studies have reported persistence of experimental infections (*in vivo* and *in vitro*) and clinical reports. The purpose of this study was to investigate *in vivo* the possible occurrence of persistent infection caused by ILHV and ROCV using young golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) as experimental model. Hamsters were inoculated intraperitoneally with a suspension of brains of newborn mice infected with titers of 9.8 and 9.6 DL50 / 0.02 mL of ROCV and ILHV respectively, and at pre-determined intervals, they were anesthetized and sacrificed for collection of blood samples, serum and urine and organ fragments during four months (120 days) post-inoculation (p.i.). Viral quantification was calculated in samples of brain, liver and blood, using the technique of Real Time RT-PCR (qRT-PCR). All collected specimens were inoculated into VERO cells for confirmation of viral replication; and viral antigens in the cell cultures were detected by indirect immunofluorescence test; the levels of antibodies were determined by hemagglutination-inhibition test. Histopathological examination by hematoxylin-eosin and detection of viral antigens by immunohistochemistry were assayed in viscera and central nervous tissue samples collected during the kinetics. The study showed that young golden hamsters are good experimental model for persistent infection by the flaviviruses ILHV and ROCV. Both viruses induced strong immune response, although the levels of antibodies to ILHV were greater than for ROCV. The ROCV has demonstrated to be more pathogenic in these animals, suggesting higher ability to cause neuronal invasiveness than ILHV. Infected viscera

samples inoculated in VERO cells resulted in growth of both viruses from all infected organ, blood, serum and urine samples and were confirmed by indirect immunofluorescence assay. Regarding persistence of infection, ROCV was detected in the brain, liver and blood by *q*RT-PCR, for three months p.i., while ILHV persistence was observed only in the brain for 30 days p.i. by *q*RT-PCR. The ROCV was able to produce histopathological changes, and immuno-labeled cells expressing viral antigens in liver, kidney, lung and brain samples during four month were confirmed by immunohistochemistry. To the ILHV, the histopathological changes and expression of viral antigens in samples from the liver, kidney and lung were only confirmed up to 30 days p.i., but the brain was positive for four months p.i.; The findings obtained in this study showed that both viruses have capacity to cause persistent infection in hamsters intraperitoneally infected, studies additional are needed to determine the pathophysiology and pathogenesis of ILHV and ROCV persistent infections.

Words Key: Persistent infection, Flavivirus, *Rocio virus* and *Ilhéus virus*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE*, GÊNERO *FLAVIVÍRUS*

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral, a família *Flaviviridae* é composta por 58 espécies de vírus com aproximadamente 70 sorotipos (FAUQUET et al., 2005). O *Vírus febre amarela* (VFA) – protótipo da referida família - foi isolado em 1927 (cepa Asibi), sendo o primeiro agente viral causador de doenças em humanos, comprovado ser transmitido por artrópodes (GUBLER et al., 2006).

Na família *Flaviviridae* são reconhecidos três gêneros: *Flavivirus* com 53 espécies virais que apresentam ou não ciclo biológico envolvendo vetor artrópode e hospedeiro vertebrado; *Hepacivirus*, no qual é reconhecido apenas como espécie o vírus da hepatite C; e *Pestivirus* com quatro espécies virais associadas a infecções em porcos e ruminantes (FAUQUET et al., 2005). O gênero *Flavivirus* destaca-se no cenário mundial por apresentar integrantes com importante impacto em saúde pública. Mais de 50% dos flavivírus conhecidos têm sido associados com doenças em humanos, incluindo alguns dos mais importantes patógenos humanos, dentre os quais: VFA, *Vírus dengue* (VDEN), *Vírus da encefalite Saint Louis* (VESL), *Vírus da encefalite japonesa* (VEJ), *Vírus West Nile* (VWN) e *Vírus da encefalite transmitida por carrapato* (*Tick-borne encephalitis vírus* - TBEV), dentre outros (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997, VASCONCELOS et al., 1998, FAUQUET et al., 2005).

Para a inclusão no gênero *Flavivirus*, são observados critérios como: (i) seqüências de nucleotídeos e de aminoácido codificada; (ii) características antigênicas; (iii) associação geográfica; (iv) associação do vetor; (v) associação do hospedeiro; (vi) associação das doenças causadas; (vii) características ecológicas (FAUQUET et al., 2005).

Com base em testes sorológicos, tais como ensaios imunoenzimáticos (ELISA), Inibição da Hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC) e teste de neutralização (TN), os flavivirus relacionam-se entre si (KARABATSOS, 1985; CASALS, 1957). Esses vírus formam complexos ou subgrupos, tais como o grupo da encefalite japonesa, do dengue, da febre amarela, Ntaya, Tick-borne encephalitis, dentre outros (FAUQUET et al., 2005).

1.1.1 Características Físico-químicas e Replicação dos Flavivirus

As partículas virais dos integrantes do gênero *Flavivirus* apresentam forma esférica ou pleomórfica, medindo 50 nm de diâmetro, sendo envoltas por um envelope de natureza lipoprotéica. O capsídeo é composto de uma única proteína (C) e o envelope contém duas proteínas de membrana, as proteínas E e M (LINDENBACH & RICE, 2003) (Figura 1).

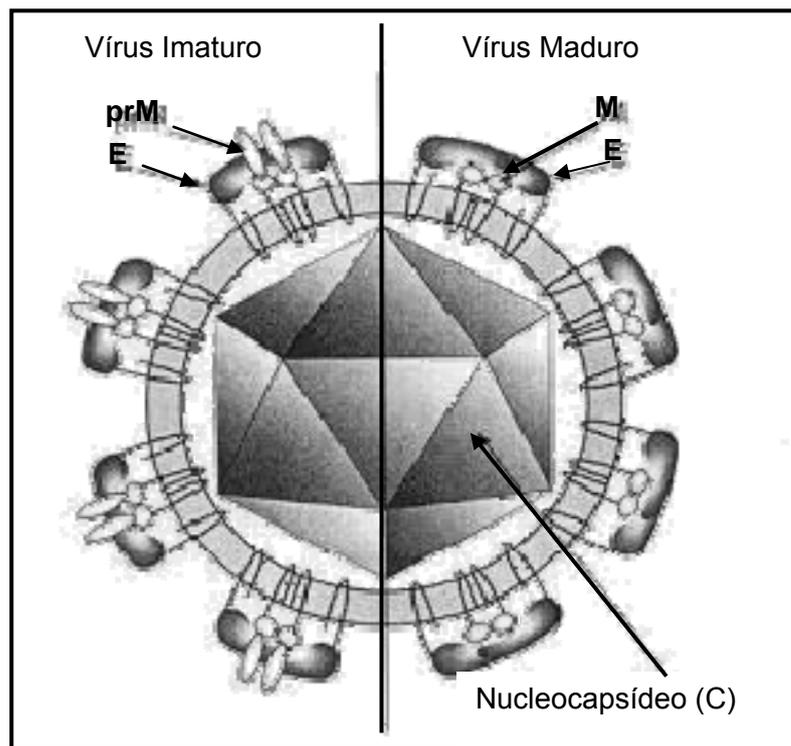


Figura 1: Esquema da estrutura dos *Flavivirus*: vírus imaturo e vírus maduro.

Fonte: Van Regenmortel et al., 2000

O genoma viral é formado por uma fita simples de RNA, não segmentado, de polaridade positiva, que apresenta uma única cadeia aberta de leitura (“Open Read Frame”- ORF), flanqueada por duas regiões não codificadoras (RUC) situadas nos terminais 5’ e 3’. A poliproteína codificada é pré e pós-traducionalmente clivada em dez proteínas, sendo três estruturais (C, PrM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH & RICE, 2003).

Dentre as proteínas estruturais, a proteína E corresponde a hemaglutinina viral, sendo reconhecida nos testes de IH, enquanto que a proteína M está associada ao processo de maturação viral, sendo encontrado um precursor prM nas partículas virais imaturas no lugar da proteína M, o qual é clivado no curso da maturação. 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). Em relação a NS1 sua atividade é desconhecida, porém em experimentos, induz resposta imune específica, constituindo o antígeno fixador de complemento, sendo encontrada dentro das células infectadas bem como na superfície celular e no meio extracelular. A NS2A pode estar envolvida no processo de montagem da partícula viral. A NS2B, além de estar associada com atividade de protease, age como co-fator da NS3. A NS4A e NS4B síntese do RNA viral. A NS1, NS3 e NS5 são altamente conservadas (FAUQUET et al., 2005; LINDENBACH & RICE, 2003) (Figura 2).



Figura 2: Esquema da organização do genoma dos *Flavivirus*.

Fonte: Rice et al., 1985.

A síntese de RNA ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE) perinuclear. Depois da tradução do RNA genômico, começa a replicação do RNA com a síntese da fita negativa complementar, a qual é usada como molde para produção adicional do genoma viral (fita RNA positiva). Este é sintetizado por um mecanismo semiconservativo envolvendo replicação intermediada (contendo regiões de fita dupla originada de fita simples) e formas de replicação. As sínteses do molde negativo nas células infectadas continuam através do ciclo de replicação. A tradução

normalmente começa no primeiro códon AUG da ORF, mas podem também ocorrer em um segundo códon AUG localizado nas posições 12 a 14, em flavivírus de mosquitos. As proteínas virais são processadas pelas proteases das células hospedeiras e proteinases serinas virais NS2B-NS3 para dar origem às proteínas estruturais maduras e proteínas não-estruturais. Essas proteínas serinas virais seguem, respectivamente, para o RE e o citoplasma, sendo determinado por um peptídeo-sinal e seqüências de parada. Proliferação e hipertrofia da membrana intracelular são características das células infectadas por flavivírus. Partículas virais podem ser primeiramente, observadas dentro do RE rugoso, o qual se acredita ser o primeiro sítio de montagem. Esses vírions imaturos são transportados 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 por uma protease celular furina ou similar à furina, para a formação das partículas maduras contendo a proteína M (FAUQUET et al., 2005; LINDENBACH & RICE, 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS FLAVIVÍRUS

Dentro do gênero *Flavivirus* podem ser incluídos vários agentes virais de grande importância em saúde pública por causar doenças em humanos e/ou animais de interesse econômico. Cerca de 40 flavivírus já foram associados à infecção humana, podendo causar, nos casos mais graves, o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) (meningoencefalites) ou sistêmico, tipo febres hemorrágicas (FAUQUET et al., 2005).

Os flavivírus têm uma ampla distribuição geográfica, porém as espécies são restritas para áreas epidêmicas específicas ou endêmicas como, por exemplo, o VFA nas regiões tropicais e subtropicais da África e América do Sul; VDEN na área tropical da Ásia, Oceania, África, Austrália, e nas Américas; VEJ no sudeste da Ásia; TBEV na Europa e norte da Ásia (FAUQUET et al., 2005).

1.2.1 Flavivírus Hemorrágicos

Nas áreas Tropicais das Américas, foram registradas epidemias urbanas de febre hemorrágica causadas pelo vírus amarelo nos séculos XVII, XVIII, XIX, e começo do século XX, bem como epidemias ocorridas na Itália, França, Espanha, e Inglaterra durante o século XVIII. Em meados do século XX, a introdução da vacina de vírus atenuado 17D, produzida por Theiler e Smith (1937), ocasionou redução no número de casos. Atualmente, a incidência da febre amarela é estimada em 220.000 casos anuais, sendo que cerca de 90% dos casos ocorrem na África, com 30.000 mortes a cada ano, o que resulta em 10-15% de letalidade (MONATH, 2001). Apesar de a vacina ser segura e eficaz, tem-se observado um aumento dramático no número de casos desde 1980 (GUBLER et al., 2006).

A febre do dengue tem distribuição global com sucessivas epidemias desde o século XVIII. A infecção pelo VDEN pode apresentar desde um quadro clínico inaparente, passando por uma síndrome febril - Dengue clássico - até formas mais severas: a febre hemorrágica do dengue com síndrome do choque. Todos os quatro sorotipos reconhecidos (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 e VDEN-4) são endêmicos nas regiões tropicais das Américas, Ásia, África e Oceania, todos os

sorotipos causam doenças similares, porém a febre hemorrágica severa e fatal tem sido mais associada com os sorotipos VDEN-2 e VDEN-3 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; GUBLER et al., 2006). Nas Américas, a frequência de epidemias tem aumentado dramaticamente desde 1980 e múltiplos sorotipos de dengue foram introduzidos. Nas regiões tropicais, a ocorrência anual é de 20 a 50 milhões de infecções, numa população sob risco de aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas (WHO, 1985; GUBLER, 2006).

Os únicos flavivírus encontrados no Brasil, capazes de ocasionar febre hemorrágica, são os VFA e VDEN. A forma hemorrágica afora a sintomatologia correspondente a febre clássica, apresenta hemorragias e diminuição do volume plasmático intravascular, o que pode levar o paciente ao choque hipovolêmico e à morte (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997).

1.2.2 Flavivírus Encefalitogênicos

Encefalite é uma inflamação do encéfalo causada por infecção, muito frequentemente de etiologia viral. A encefalite por arbovírus é estabelecida após transmissão viral por insetos hematófagos ao hospedeiro vertebrado. O vírus entra pela corrente sanguínea e se dispersa (viremia) alcançando o cérebro. A replicação viral recruta células inflamatórias no tecido nervoso (encefalite) ou na meninge (meningite). Essas duas infecções do sistema nervoso central frequentemente ocorrem juntas na infecção por arbovírus, caracterizando um quadro de meningoencefalite (VASCONCELOS et al, 1991).

As epidemias de encefalites por flavivírus são determinadas por um conjunto de fatores tais como: clima, alterações ambientais, vetor artrópode, comportamento humano e características intrínsecas do vírus e do hospedeiro, que não são completamente compreendidos. Esses vírus podem ser mantidos em natureza em ciclos enzoóticos, envolvendo pássaros e, principalmente, mosquitos do gênero *Culex*. Os humanos são usualmente infectados quando interferem neste ciclo, mas são considerados “hospedeiros finais”, porque normalmente não produzem uma taxa virêmica suficientemente elevada e prolongada para sustentar a transmissão do vírus a outros artrópodes (SOLOMON, 2004).

Uma grave epidemia de encefalites ocorreu no Japão em 1924, o agente foi isolado de cérebro humano e foi feita uma passagem em coelhos. Em 1934, Hayashi reproduziu a doença, inoculando o vírus em macacos, e o nomeou “*Vírus da encefalite japonesa*”. A infecção pelo VEJ pode se manifestar a partir de uma síndrome febril, meningite ou encefalite.

O VESL foi isolado em 1933, em Saint Louis, Missouri, Estados Unidos, a partir de uma suspensão de cérebro de caso fatal de encefalite. No Brasil, o primeiro isolamento do VESL foi a partir de lote de *Sabethes belisarioi*, capturados no Km 94 da rodovia Belém-Brasília/Estado do Pará, 1960. Dois isolamentos humanos foram obtidos de pacientes febris em Belém, que apresentaram quadro de encefalite (VASCONCELOS et al, 1992).

Recentemente, em 2004, na cidade de São Pedro, Estado de São Paulo o VESL foi isolado de um paciente febril que apresentava quadro clínico semelhante á

dengue, chamando a atenção para os casos de doenças febris de origem desconhecida (ROCCO et al., 2005). Esse vírus causa uma doença aguda no homem, com um espectro de manifestações que varia de uma síndrome febril à fatal meningoencefalite, mas que aparentemente não é patogênico para cavalos (VASCONCELOS et al., 1991). Está distribuído amplamente da Argentina ao Canadá. Nos EUA, o VESL ocorre endemicamente, embora ocasionalmente torne-se epidêmico. Surto também têm ocorrido no Canadá e México. Nas Américas do Sul e Central, infecções humanas detectadas por inquéritos sorológicos são freqüentes, mas epidemias são desconhecidas (VASCONCELOS et al., 1991; PINHEIRO et al., 1981).

Há prevalência de anticorpos para VESL em várias pequenas e grandes comunidades do Brasil, particularmente na Amazônia brasileira a prevalência média é de aproximadamente 5%. A letalidade varia de 5 a 10% na encefalite de Saint Louis, podendo chegar a 20% durante epidemias e essa letalidade aumenta com a idade. (PINHEIRO & TRAVASSOS DA ROSA, 1997).

No continente americano, sete vírus têm causado quadros de encefalite. São eles o VESL, o *virus encefalite Califórnia* (VEC), *Virus Encefalite Eqüina Leste* (VEEE) e *Virus Encefalite Eqüina Oeste* (VWEE), *Virus da encefalite equina Venezuelana* (VEEV), *Virus Rocio* (VROC) e *Virus Powassan* (VPOW). Esses vírus constituem uma importante causa de morbi-mortalidade eqüina e humana e têm em comum um especial tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), acometendo-o em diferentes graus de severidade (VASCONCELOS et al., 1991). Epidemiologicamente, os vírus VESL, VEEE, VWEE, VEEV e VROC são

responsáveis por quadro de doença endemo-epidêmica, enquanto VEC e VPOW causam infecções esporádicas e endêmicas. No Brasil há registro da circulação dos vírus VEEE, VWEE, VEEV, VESL e VROC (VASCONCELOS et al., 1991).

1.3. FLAVIVÍRUS ESTUDADOS

1.3.1 *Virus Ilheus*

O isolamento original do *Virus Ilheus* (VILH) foi obtido a partir de um lote misto de mosquitos *Aedes spp.* e *Psorophora spp.* capturados em Ilhéus, Bahia, em 1944 (KARABATSOS, 1985). O VILH é encefalitogênico, sendo entre estes o arbovírus mais distribuído no Brasil, em particular na Amazônia brasileira, onde tem sido isolado sistematicamente de diversas espécies de animais silvestres e artrópodes vetores, principalmente, de *Psorophora ferox*, mas também de modo esporádico de seres humanos (CALISHER et al., 1989; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997).

Um estudo realizado pelo Instituto Adolfo Lutz do Estado de São Paulo relatou o isolamento do VILH e a detecção de anticorpos específicos em aves residentes, migratórias e de cativeiro, em sagüis e quatis, comprovando a presença desse agente no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo. O comportamento migratório de aves silvestres pode determinar a introdução do vírus em outras regiões. Considerando-se a patogenicidade para o homem e a confirmação da circulação desse agente viral em área urbana, freqüentada para atividade de lazer e

de educação, o risco de ocorrência de infecção na população humana não pode ser descartado (PEREIRA et al., 2001).

O VILH tem sido isolado em diferentes países da América do Sul e Central, especialmente no Brasil e Trinidad. A imunidade para o vírus é amplamente distribuída em muitos países tropicais das Américas, entretanto epidemias não têm sido relatadas, provavelmente porque o principal vetor, *Psorophora ferox* apresenta hábitos silvestres. Populações humanas apresentam imunidade para o VILH, com taxas variando de 3,4% até 36%, é importante ressaltar o elevado percentual de positividade encontrado em áreas onde o vírus tem sido isolado. O número de casos clínicos com diagnóstico específico confirmado, no entanto é baixo, em contraste com a alta prevalência de anticorpos para esse vírus, sugerindo que a maioria das infecções pode ser branda ou inaparente (CRUZ et al., 1997).

Casos humanos de infecção natural com o VILH têm sido também recentemente observados no Brasil, e este vírus pode ser considerado como um vírus potencialmente emergente.

1.3.2 *Virus Rocio*

A encefalite causada pelo VROC foi detectada pela primeira vez em 1975, no litoral sul do estado de São Paulo, onde provocou uma epidemia no período compreendido entre março e junho desse ano, durante a qual foram notificados 465 casos (TIRIBA, 1975, TIRIBA et al, 1976; LOPES et al, 1978; PINHEIRO & TRAVASSOS DA ROSA, 1997). No mesmo ano, o VROC foi isolado a partir de

cerebelo e medula espinhal de caso humano fatal de encefalite (KARABATSOS, 1985).

O ciclo não está definido, mas existem fortes evidências indicando que o vírus circula entre mosquitos ornitofílicos e aves silvestres (MITCHELL et al., 1986).

Na região do Vale do Ribeira, São Paulo, no período compreendido entre 1973 e 1980 o VROC, foi responsável por uma epidemia em seres humanos com mais de mil casos conhecidos de encefalite tendo sido descritos, 100 mortes e mais de 200 casos de seqüelas graves do SNC (IVERSSON, 1988, IVERSSON et al., 1992). No mesmo período, cinco casos de encefalites foram também descritos na região nordeste do Estado do Paraná, em áreas limítrofes da região afetada no Estado de São Paulo (IVERSSON, 1998).

Em 1985, Figueiredo descreveu um caso de uma moradora da região de Ribeirão Preto (noroeste do Estado de São Paulo) com anticorpos neutralizantes para o VROC, com sorologia negativa para outros flavivírus circulantes no Brasil e sem relato de residência ou viagens para o litoral do Estado de São Paulo. No ano seguinte em uma menina de 12 anos foram detectados anticorpos hemaglutinantes e neutralizantes para o VROC, entre os 288 habitantes do povoado de Corte de Pedra, município de Valença-Bahia, sem história de viagens anteriores para outra região do Estado da Bahia ou do País e, sem também, quadro clínico recente ou passado, compatível com doença neurológica (STRAATMANN et al., 1997).

Em maio de 1995, durante a epidemia de VDEN-2 na cidade de Salvador,

três casos investigados e inicialmente suspeitos dessa virose apresentaram anticorpos IgM (MAC-ELISA) para o VROC. Foi confirmada a presença de anticorpos neutralizantes em dois dos casos investigados, os dois pacientes apresentaram cefaléia prolongada. Os três pacientes negaram viagem ou outro deslocamento para fora da cidade de Salvador nos seis meses que antecederam a infecção (STRAATMANN et al., 1997).

De julho a dezembro de 1995, nas localidades de Ipujiara e Prado, Estado da Bahia, foi realizado inquérito soro-epidemiológico para arboviroses. Dos 689 soros testados, cinco (0,7%) apresentaram anticorpos (inibidores da hemaglutinação e neutralizantes) para VROC. Não se pode afastar a hipótese que estes casos com anticorpos N para VROC, inclusive os anteriormente descritos não sejam devidos à infecção por outro flavivírus antígenicamente relacionado ao mesmo, entretanto ao que tudo indica o VROC foi o responsável pelas infecções (STRAATMANN et al., 1997).

1.4 ANATOMIA PATOLÓGICA DOS FLAVIVIRUS ENCEFALITOGÊNICOS

A neuropatogênese dos flavivírus envolve a neuroinvasão (capacidade do vírus entrar no SNC) e neurovirulência (capacidade de replicação do vírus no SNC) (MONATH, 1986) e ambas as situações podem ser manipuladas experimentalmente. Em roedores, a neurovirulência é uma propriedade inerente dos flavivírus encefalitogênicos, e a quantidade de vírus necessária para causar infecção no SNC é normalmente pequena. Vírus com baixa capacidade de replicação no sistema

nervoso periférico (SNP) geralmente pode ser classificado como de baixo potencial neuroinvasivo, independentemente dos níveis intrínsecos da neurovirulência. Existe ainda uma relação entre o potencial do vírus para gerar viremia e a neuroinvasão, isto é aplicado para a maioria das infecções adquiridas naturalmente (CHAMBERS & DIAMOND, 2003).

Em cultura celular, os flavivírus podem infectar uma variedade de células, incluindo epiteliais, endoteliais e fibroblastos (AVIRUTNAN et al., 1998; BIELEFELDT-OHMANN, 1998; DIAMOND et al., 2000; KURANE et al., 1992), mas as relações destes resultados para replicação *in vivo* são incertas. Depois da inoculação periférica, os flavivírus não se replicam na pele, mas são levados para os linfonodos pelas células dendríticas imaturas ou pelas células de Langerhans, as quais são permissíveis à infecção (BYRNE et al., 2001; JOHNSTON et al., 1996, 2000; LIBRATY et al., 2001; MCMINN et al., 1996; WU et al., 2000). No primeiro dia da infecção, células de Langerhans expressam antígenos virais que migram da pele para o linfonodo (BYRNE et al., 2001; WU et al., 2000), enquanto expressam marcadores tais como, B7-1, B7-2, MHC de classe II, CD11b, e CD83. Estas células produzem fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) e se tornam mais resistentes para flavivírus (HO et al., 2001). Embora o tropismo das viroses encefalíticas pelos tecidos linfóides tenha sido observado, não tem sido reconhecido outro tipo de célula em outros compartimentos que suportam a replicação nos níveis necessários para gerar viremia suficiente para causar neuroinvasão (CHAMBERS & DIAMOND, 2003).

Após a replicação nos tecidos linfóides, os flavivírus encefalíticos saem da

via eferente linfática e ganham acesso à circulação e, assim, a infecção sistêmica é estabelecida (MALKOVA & FRANKOVA, 1959).

A viremia permite a expansão para órgãos viscerais secundários (fígado, rim e baço) e para as viroses encefalíticas, facilita o cruzamento da barreira hematoencefálica por um mecanismo não caracterizado, embora, acredita-se que o cruzamento dessa barreira seja feito de forma passiva pelo endotélio, pela atividade de replicação nas células endoteliais, ou por um mecanismo no qual o vírus é carregado para dentro do cérebro pelas células inflamatórias (DIAMOND, 2003).

No SNC, o neurônio é o alvo primário dos flavivírus encefalíticos (ELDADAH et al., 1967; HASE et al. 1993; IWASAKI et al., 1986; KIMURA-KURODA et al., 1992; WANG et al., 1997; WEINER et al., 1970; XIAO et al., 2001). Neurotropismo e neurovirulência virais, são determinadas pela proteína viral E, como têm mostrado dados genéticos indicando que mutação nesta proteína modula este fenótipo. Essa proteína também está envolvida com a entrada do vírus na célula hospedeira (CHAMBERS & DIAMOND, 2003).

Nas encefalites, as lesões fundamentais desenvolvem-se ao nível dos neurônios, que apresentam variado grau de degeneração e necrose acompanhadas ou não de neurofagia; proliferação glial e infiltrados perivascular e meníngeos, quase sempre do tipo mononuclear. As características anatômicas das encefalites nem sempre mostram uma localização topográfica efetiva, embora, com certa frequência, algumas estruturas sejam mais atingidas como, por exemplo, nas infecções pelo VEJ e *Virus Encefalite Murray Valley* (VEMV) cuja células de Purkinje do cerebelo

estão seriamente comprometidas; já com o VROC, as lesões do tálamo, núcleo denteado e núcleos hipotalâmicos mostram uma topografia relativamente constante (PINHEIRO & TRAVASSOS DA ROSA, 1997).

1.5 INFECÇÃO PERSISTENTE

O termo “Infecção persistente” indica que as partículas virais ou produtos virais não são completamente eliminados pela resposta imunológica adaptativa e continuam sendo produzidos por longos períodos. As partículas infecciosas podem ser produzidas contínua ou intermitentemente por meses ou anos. Em algumas situações, o genoma viral permanece por longos períodos na célula infectada, mesmo depois de cessar a detecção das proteínas virais. Existem três tipos de infecções persistentes: (i) infecção crônica, em que o vírus é continuamente replicado e excretado; (ii) infecção lenta em que ocorre um longo período entre a infecção aguda primária e o surgimento dos sintomas, havendo produção contínua de vírus durante esse período; e (iii) infecções latentes, em que o vírus persiste numa forma “não infecciosa” com períodos intermitentes de reativação (SANTOS et al., 2008).

Estudos *in vitro* de infecção persistente por flavivírus mostraram sobrevivência de uma população residual de células que permaneceram infectadas e mostrando baixo nível de replicação viral por período de tempo prolongado. Os vírus detectados nestas células apresentam freqüentemente, alterações fenotípicas, incluindo redução do tamanho das placas produzidas em cultivo de células VERO bem como variação na sensibilidade às temperaturas (RANDOLPH & HARDY, 1988;

SHAH & GADKARI, 1987), restrição da variabilidade de hospedeiros susceptível e diminuição na virulência para camundongos (IGARASHI, 1979). Essas infecções são também associadas com defeitos nas partículas virais, bem como nos RNAs que formam a base para a infecção persistente (CHAMBERS & DIAMOND, 2003).

Vírus isolados de animais com infecção persistente podem exibir mudanças fenotípicas tais como baixa capacidade de produzir antígenos hemaglutinantes, redução na neurovirulência e variação na sensibilidade à temperatura similar ao observado na infecção persistente em cultura de células (MONATH, 1990).

Para um vírus causar infecção persistente ele deve diminuir ativamente a resposta imune anti-viral do hospedeiro. Por isso, um importante efeito da replicação viral persistente está na desordem da homeostase do hospedeiro, causando a doença sem destruir a célula infectada; a melhora da infecção viral pode ser explicada pela restauração da função normal da célula. A anatomia da infecção persistente em tecidos e células com funções específicas, como produção de hormônio de crescimento (HG), neurotransmissores, expressão de MHC e co-estimuladores de moléculas foram normais pela alta e baixa resolução microscópica. Assim, o vírus causa doença por alterar a seletiva função de cada tipo de célula especializada sem destruir célula alguma (OLDSTONE, 2005).

No SNC, infecção persistente tem sido associada a fatores da resposta imune, assim como a habilidade dos neurônios para sobreviver a infecções virais por mecanismo envolvendo moduladores apoptóticos (CHAMBERS & DIAMOND, 2003).

A expressão de moduladores apoptóticos é um importante fator que influencia o estabelecimento e a manutenção da infecção persistente. No modelo de infecção pelo VEJ, a persistência em algumas células foi facilitada pela expressão da proteína bcl-2 (LIAO et al., 1997), indicando que o mecanismo é análogo para os alphavírus, onde a infecção lítica pode ser convertida para persistente na presença de proteínas antiapoptóticas (LEVINE et al., 1993). Entretanto, o mecanismo que confere resistência para VEJ induzido por apoptose, pode ou não, ser diferente para outros vírus. É provável que esta diferença envolva caminhos específicos para a ativação do processo apoptótico (JAN et al., 2000; SU et al., 2002). Ainda não se têm evidência que os vírus do gênero *Flavivirus* codifiquem proteínas com propriedades anti-apoptóticas que possam influenciar o processo de persistência.

Infecção persistente *in vivo* e *in vitro* tem sido pouco descrita em trabalhos experimentais o que dificulta um melhor entendimento sobre o fenômeno de persistência por flavivírus. Siirin e colaboradores (2007), em estudos de infecção persistente pelo VESL usaram como modelo experimental hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) inoculados intraperitonealmente (i.p.). Os animais permaneceram assintomáticos e desenvolveram altos níveis de anticorpos neutralizantes específicos no soro. Apesar disso, uma parte dos hamsters continuou mostrando infecção viral na urina (virúria) por um período de tempo prolongado. Mudanças histopatológicas foram observadas nos tecidos coletados (rim, pulmão e cérebro), antígenos do VESL foram detectados por imunohistoquímica no intestino, epitélio tubular do córtex renal e neurônios do córtex cerebral. Vírus isolado de urina e tecido de hamsters cronicamente infectados pelo VESL foram sequenciados, e comparados com a cepa do VESL que foi inicialmente inoculada e duas mutações

com substituições no aminoácido foram observadas em todas as cepas virais isoladas dos hamsters infectados. Estes achados foram muito similares às descrições anteriores sobre infecções crônicas pelos VWN, *Vírus Modoc* (VMOD) e encefalite Russa em carrapato, enfatizando o importante potencial das infecções persistentes pelos flavivírus nos vertebrados (SIIRIN et al., 2007).

O potencial do VWN tem sido muito estudado. Em um trabalho experimental com hamsters adultos, foi observado virúria após 52 dias (TONRY et al., 2005). Por outro lado, descrita a persistência do VWN no soro e SNC de um paciente imunocomprometido por quatro meses após a infecção inicial, sugerindo que pacientes imunocomprometidos, cuja depressão imune envolva a imunidade humoral possam não produzir resposta sorológica e que isto facilite a infecção permanente do VWN, que se expressa pela infecção persistente do SNC (PENN et al., 2006). Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente com o VWN desenvolveram infecção crônica renal, e observou-se nos animais somente alterações patológicas moderadas nos rins ou cérebros de hamsters cronicamente infectados. Observou-se também que o vírus sofre alterações genéticas e fenotípicas durante a infecção persistente (TESH et al., 2005).

Infecção persistente foi observada em cultivos primários de neurônios e astrócitos de camundongos com o VWN. Interessante observar neste estudo, que nas culturas mistas de neurônios e astrócitos, os primeiros rapidamente eram infectados, apresentavam efeito citopático (ECP) e, em seguida, sofriam lise, enquanto os astrócitos eram infectados lentamente e um discreto ECP era observado sem contudo ocorrer destruição das células o que resultou em infecção

persistente por mais de 100 dias (DINIZ et al., 2006).

Infecção persistente foi observada em cultura de células de mamíferos pelo VEJ. Num estudo foram realizadas 40 passagens em um período de 14 meses, e antígenos virais foram detectados por imunofluorescência (SCHMALJOHN et al., 1997). O VEMV, cepa OR2, foi serialmente passado em cultura de células VERO para estabelecer infecção persistente e as culturas foram observadas por 300 dias. Desse experimento foi concluído que as partículas defectivas estabelecem e mantêm infecção persistente em células VERO (POIDINGE et al., 1991).

Infecção persistente pelo VESL foram estabelecidas em três linhagens de células de mosquito (*Aedes albopictus*, *A. dorsalis* e *Culex tarsalis*) e foram observadas por dois anos. Todas as três culturas de células com infecção persistente compartilharam duas características: Não houve ECP e foi relativamente alta a proporção de células infectadas (41% a 85%) (HARDY & RANDOLPH, 1988).

2 JUSTIFICATIVA

Os vírus VILH e VROC são de importância para a saúde pública no Brasil, considerando a patogenicidade para o homem e a possibilidade da circulação desses agentes virais em áreas urbanas.

Como estudos *In vitro* tem demonstrado uma redução na virulência, alterações fenotípicas significativas que interferem na infectividade viral, tanto do SNC quanto dos hospedeiros comumente infectados por esses vírus (Vlaycheva & Chambers, 2002), os estudos em animais de laboratório servem como uma importante ferramenta para melhorar a compreensão dos mecanismos determinantes da infecção persistente por flavivírus, sobretudo a utilização dos hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). Esses animais têm sido usados com bons resultados como modelo experimental para diversos arbovírus tendo demonstrado eficiente susceptibilidade aos flavivírus (TESH et al., 2001; XIAO et al., 2001; 2003). Além disso, em um estudo preliminar com o VILH, houve indícios de infecção persistente nesses animais, sugerindo que a mesma se dará com o vírus VROC, pois análises filogenéticas demonstraram uma relação genética íntima entre esses vírus. (MEDEIROS et al, 2007).

A descrição de epidemias aliada ao fato do reconhecimento de casos de infecção persistente *in vitro*, *in vivo* e relatos clínicos para outros flavivírus, torna importante verificar a ocorrência de infecção persistente pelos flavivírus VILH e VROC, em um modelo experimental em hamsters jovens.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar a ocorrência de infecção persistente causada pelos VILH e VROC em hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*)

3.2. ESPECÍFICOS

(i) Verificar as alterações histopatológicas causadas pelos VILH e VROC em hamsters dourados jovens por um período de 120 dias;

(ii) Detectar antígenos virais por imunohistoquímica em amostras teciduais de hamsters infectados pelos VILH e VROC;

(iii) Investigar a presença dos vírus em estudo nas amostras de tecidos, sangue, soro e urina de hamsters;

(iv) Descrever o perfil da resposta sorológica de anticorpos específicos contra os flavivírus em estudo;

(v) Quantificar partículas virais nos espécimes biológicos dos hamsters no período de até 120 dias p.i., pela técnica de RT-PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS E ESTOQUE VIRAL

Para este estudo foram selecionados os vírus VILH (BE H 7445) e VROC (SP H 34675), provenientes do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC). A cepa utilizada do VILH (BE H 7445) foi isolada em 1957 pelo IEC, a partir do sangue de um paciente febril, procedente da Colônia Japonesa no Guamá, localizado no município de Belém, no Estado do Pará (item 1.3.1). O isolamento original do VROC (SP H 34675) foi a cepa utilizada neste estudo, que já foi descrita anteriormente (item 1.3.2).

Os estoques virais foram feitos a partir das amostras liofilizadas, as quais foram reconstituídas com 0,5 mL de água destilada estéril e 0,5 mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,4, contendo albumina bovina 0,75% e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Posteriormente, as amostras foram inoculadas em camundongos albinos suíços recém-nascidos (2-3 dias de vida) (Figura 3), na quantidade de 0,02 mL, por via intracerebral (ic).

Após a inoculação, os animais foram observados diariamente até o aparecimento de sinais de doença. Os camundongos que apresentaram sinais de doença foram sacrificados e identificados, sendo conservados a temperatura de –70°C para uso posterior.



Figura 3. Inoculação por via i.c. em camundongo albino suíço recém-nascido.

Fonte: SAARB/IEC

4.2 TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS VIRAIS

A suspensão viral foi preparada a partir de cérebros de camundongos albinos suíços recém-nascidos infectados com as amostras virais (VILH e VROC) e macerados em PBS, pH 7,4, contendo albumina bovina 0,75% e antibióticos como descrito no item 4.1, seguido de centrifugação a 8.000 rpm por dez minutos. A titulação viral foi realizada a partir do preparo de diluições seriadas de dez vezes (de 10^{-1} a 10^{-12}) da suspensão viral, seguido de inoculação via ic de 0,02 mL em camundongos albinos suíços recém-nascidos. Os camundongos infectados foram examinados diariamente, sendo as observações anotadas em cartões de seguimento. As leituras foram feitas até permanecerem inalteradas por um período de três dias. Os títulos virais foram calculados pelo método de Reed & Muench (1938) e expresso como $DL_{50}/0,02$ mL (dose letal capaz de matar 50 % dos camundongos infectados).

4.3 PRODUÇÃO DOS SOROS HOMÓLOGOS

A produção dos soros homólogos aos vírus utilizados (VILH e VROC) foi realizada em camundongos albinos suíços jovens (três a quatro semanas de vida). Quatro inoculações foram administradas via i.p. em intervalos de sete dias, na quantidade de 0,2 mL de suspensão de cérebro de camundongos infectados pelos VILH e VROC, preparada na proporção de 1:10 em uma solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%). Após um intervalo de uma semana da última inoculação, foi coletado 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 nos testes sorológicos.

4.4 CINÉTICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM HAMSTERS DOURADOS

A cinética de infecção foi realizada em hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*). O inóculo foi preparado a partir de cérebros de camundongos albinos suíços recém-nascidos infectados com as amostras virais, em PBS, pH 7,4, contendo albumina bovina 0,75% e antibióticos e foi inoculado 0,1 mL pela via i.p. da suspensão viral, com o título de 10^{-2} e 10^{-3} (títulos pré-estabelecidos) para os vírus VILH e VROC, respectivamente. Essa suspensão viral foi administrada em 30 animais e 15 foram reservados para controle negativo (animais não inoculados). Os animais inoculados e o grupo controle foram observados diariamente. A cada 24 horas (hs) por um período de sete dias e em intervalos de 15

dias durante quatro meses (120 dias) p.i., três hamsters, (dois infectados com as amostras virais e um controle), foram anestesiados e sangrados, por punção cardíaca, coletou-se a urina e foram sacrificados para retirada de fígado, baço, rins, pulmões, coração e cérebro. As alíquotas de sangue, soro e urina foram armazenados a -70 °C para estudos sobre a viremia, detecção de antígenos e/ou anticorpos. As vísceras e cérebro foram separados em duas partes, uma destinada à detecção de antígenos por imunofluorescência indireta (IFI) e titulação viral nos tecidos, sendo conservada a -70 °C, e outra para realização de estudo histopatológico e imunohistoquímico, sendo então fixada em solução de formalina tamponada a 10%.

4.5 DETECÇÃO DE ANTICORPOS

4.5.1 Inibição da Hemaglutinação (IH)

O teste de IH foi descrito por Clarke & Casals (1958) e adaptado para microplacas por Shope (1963). Para a realização do teste, os soros foram inicialmente tratados por acetona e adsorvidos por hemácias de ganso e posteriormente, testados contra quatro unidades dos antígenos dos VROC e VILH produzidos na SAARB do IEC.

Os soros tratados e adsorvidos foram testados usando diluições de 1: 20 até 1: 5120. O teste foi desenvolvido como segue: no 1º e 2º orifício da microplaca foi adicionado 25 µL do soro tratado. Acrescentou-se 25 µL de solução de albumina

bovina a 0,4% diluída em pH 9,0 do 2º ao 8º orifício da microplaca. Em seguida, se transferiu com micropipeta multicanal 25 µL do conteúdo do 1º ao 8º orifício da microplaca e acrescentou-se 25 µL do antígeno diluído para 4 unidades hemaglutinantes. Foram deixadas em repouso a 4°C por no mínimo 2 hs; Após esse período se adicionou 50 µL do sistema revelador que é constituído por uma mistura de hemácia de ganso em Dextrose, Gelatina e Veronal (DGV)-1:5 diluída em solução de pH apropriado (6,4 para ambos os vírus estudado), foi agitado a microplaca e incubado por 30 minutos em temperatura apropriada (VILH a 37 °C e VROC em temperatura ambiente (TA)).

A leitura do teste foi realizada observando a sedimentação das hemácias de ganso nos soros positivos, uma vez que os anticorpos específicos presentes nos soros testados estão inibindo a atividade hemaglutinante do vírus. Se não ocorreu sedimentação das hemácias de ganso o resultado foi considerado negativo (Figura 4).

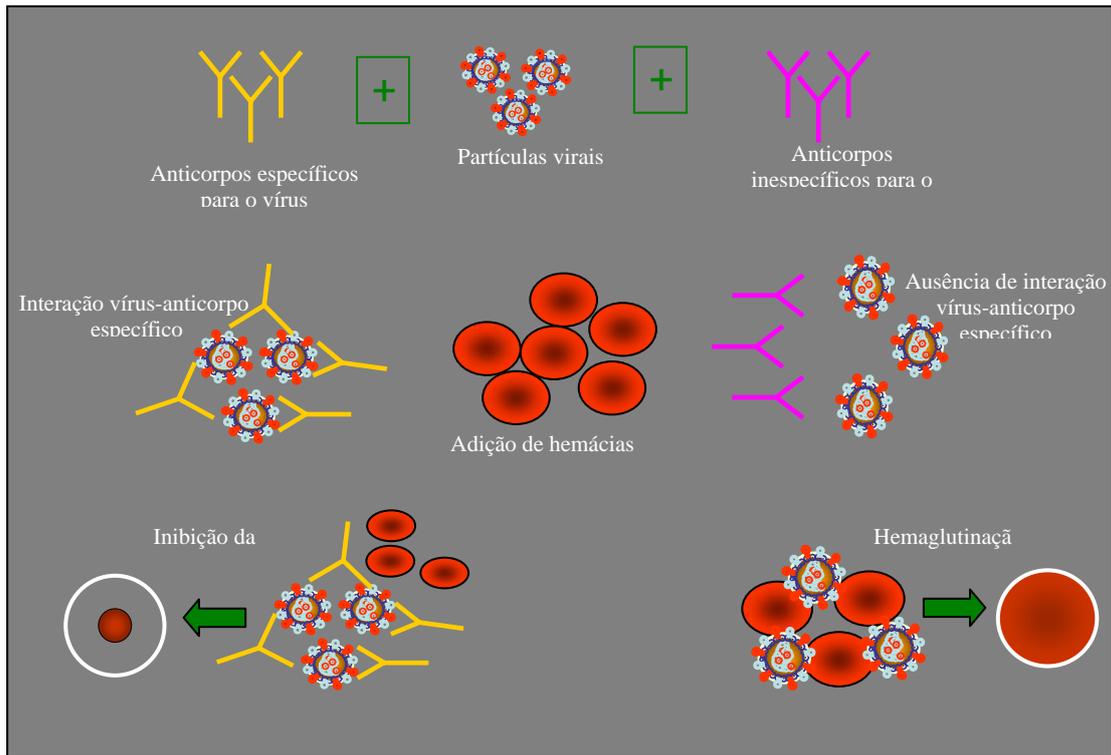


Figura 4: Esquema do teste de Inibição da Hemaglutinação.

Fonte: SAARB/IEC.

4.6 REPLICAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS VERO

Para a confirmação de replicação viral em órgãos, sangue, soro e urina dos hamsters infectados foi utilizada a linhagem de células VERO, proveniente de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

As células VERO foram semeadas em tubos e colocadas em estufa (NAPCO) com atmosfera contendo 95% de ar e 5% de CO₂, à 37°C. O meio de crescimento utilizado para as células VERO, foi o meio 199 suplementado com 2% de L-glutamina 200mM, 1% de HEPES, 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 1,5 g/l de bicarbonato de sódio (LENNETTE, 1995). Antes das células serem infectadas, o meio de crescimento foi

trocado pelo meio de manutenção, o qual é semelhante ao de crescimento, exceto na concentração de SBF que diminui para 2% (LENNETTE, 1995).

Os fragmentos de órgãos, o sangue, o soro e a urina de hamsters infectados e armazenados a -70° C coletados durante a cinética foram inoculados nos cultivos celulares após o estabelecimento de uma monocamada celular. Os inóculos foram preparados a partir de fragmentos de órgãos macerados, sendo preparada uma suspensão na proporção de 1:10 em PBS, pH 7,4, contendo albumina bovina 0,75% e antibióticos. A suspensão foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos à 4° C. O sobrenadante foi inoculado na proporção 1:100 em meio de manutenção. Os sangues, soros, e urinas, foram inoculados diretamente no meio de manutenção na proporção final de 1:50. Os tubos inoculados foram observados diariamente em microscópio invertido (Olympus modelo CK-2) para detecção de ECP. A confirmação da infecção viral foi feita pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando anticorpos policlonais preparados para os vírus em estudo obtidos em camundongo (item 4.3).

4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com a técnica descrita por Tesh (1979) foi utilizado para detecção de antígeno viral, em caso de replicação viral. Para a realização deste teste foi feito um preparo de lâminas a partir de cultivo celular em células VERO. Foram adicionados 2 mL de tripsina na garrafa contendo as células infectadas para destruir a monocamada formada e desprender as células. Após homogeneizar a suspensão de células foi colocado 20 μ L em cada

círculo das lâminas e deixou-se secar a TA. Em seguida, o material foi fixado nas lâminas, o que foi feito em acetona gelada por 10 minutos. As lâminas secaram a TA.

A formação do complexo antígeno-anticorpo foi feita pela adição de 10 µL de soro homólogo dos flavivírus em estudo (anti-VILH e anti-VROC) diluídos 1:20 em PBS pH 7,4, em cada *spot* das lâminas. Para o controle positivo foi adicionado nos *spots* da lâmina uma suspensão de células infectadas pelos vírus em estudo e para o controle negativo, suspensão de células não infectadas. 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 e foram deixadas mergulhadas 10 minutos nesta solução, passou-se rapidamente em água destilada e deixou-se secar à TA. Em seguida, foi adicionado 10 µL de anti-imunoglobulina de camundongo marcada com fluoresceína, diluída 1:80 em PBS pH 7,4. Colocaram-se as lâminas à estufa a 37°C, em câmara úmida durante 30 minutos. Lavou-se as lâminas em PBS pH 7,4, por imersão durante 10 minutos nesta solução, passou-se rapidamente em água destilada e secou-se 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 imunofluorescência (Figura 5).

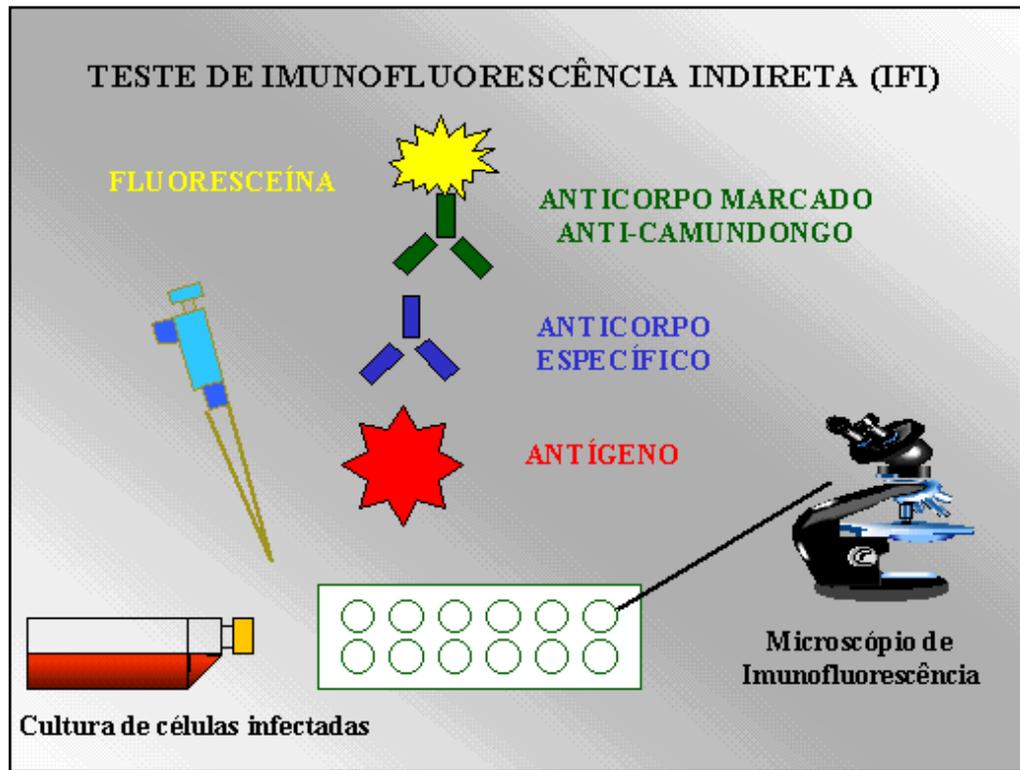


Figura 5: Esquema do teste de Imunofluorescência Indireta

Fonte: SAARB/IEC

4.8 CURVA VIRÊMICA

Para analisar a curva virêmica produzida pelos vírus, à quantificação viral foi determinada a partir de sangue, fragmentos de cérebro e fígado coletados durante a cinética das infecções experimentais (três meses p.i. para o VROC e quatro meses p.i. para o VILH). Os resultados foram obtidos através da técnica Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR), utilizando o aparelho 7500 *real time* PCR system (Applied Biosystem). Após a extração do RNA viral das amostras em estudo com Trizol LS (Invitrogen, EUA), a reação foi realizada com o kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen). Foi preparada uma reação final de 25 μ L, contendo: 0,5 μ L de SuperScript III RT Platinum Taq Mix, 0,2 μ M de cada iniciador

específico (quadro 1) para os vírus em estudo, 12,5 µL de 2x SYBR Green e 5 µL de RNA extraído das amostras em questão. A amplificação foi realizada seguindo as etapas: (i) Transcriptase Reversa (RT) a 50 °C por 3 minutos; (ii) Desnaturação a 95 °C por 5 minutos; (iii) PCR em 40 ciclos cada um contendo os seguintes passos: Desnaturação a 95 °C por 15 segundos; anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 30 segundos. Com a temperatura encontrada (T_m) dos amplicons específicos na faixa de 79.8-82.0 °C.

Análises dos resultados da qRT-PCR foram realizadas através da curva padrão. Para obtenção desta curva, amostra controle positiva do VROC e VILH foram previamente tituladas por plaqueamento em células VERO como descrito por Kuno (1998b) para determinar o título que será utilizado como referência para a diluição do RNA viral extraído dos vírus controles. Foram realizados qRT-PCR dessas diluições para obtenção do CT (ciclo no qual o produto da PCR atinge um limiar de fluorescência determinado), e baseando-se no valor de CT encontrado para cada uma das diluições formou-se a curva padrão. Desta curva foi retirada uma equação que foi utilizada para comparação com os valores CT das amostras coletadas durante a cinética, encontrando o valor relativo de carga viral dessas amostras em PFU/mL.

VÍRUS	NOME	SEQUENCIA	TAMANHO (pb)	LOCALIZAÇÃO
VROC	ROCV/NS5R	5' - GCT TCT GGA GTC CCT TTC CT - 3'	200	NS5
	ROCV/NS5F	5' - GGC AAG GTT TCT TGA GTT CG -3'		
VILH	ILHVNS5R	5' - TGT ACC CAA GTT TCT GGA GT - 3'	196	NS5
	ILHVNS5F	5' - TTC TTG GAA TTT GAA GCA TT - 3'		

Quadro 1: Modelo de Iniciadores específicos utilizados para os VROC e VILH.

4.9 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os fragmentos de vísceras (fígado, baço, rins, pulmões, coração) e tecido nervoso dos hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), retirados a cada 24 hs durante sete dias e a cada 15 dias durante 120 dias p.i. com os VILH e VROC, foram fixados em solução formalina tamponada 10% e processados segundo técnica histopatológica de rotina de laboratório de anatomia patológica, que consiste: na passagem do tecido em diversas soluções de álcool seriadas, iniciando com álcool a 70% progredindo até o etanol absoluto (100%); posteriormente, foram realizadas duas passagens em xilol a TA, seguida da imersão em dois banhos de parafina a 60°C. Por fim, a inclusão e formatação de blocos de parafina que, depois de resfriados, foram seccionados utilizando micrótomo rotativo (Jung Histocult 820-Leica), para obtenção de cortes de 5 µM de espessura, que foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992; MICHALANY, 1998; BARROS, 2000).

As análises histopatológicas foram realizadas em microscópio óptico, observando as alterações morfológicas quantificando-as em uma escala de 0-3, sendo 0=ausência de lesão, 1=lesão leve, 2=lesão moderada, 3=lesão intensa (XIAO *et al.*, 2001, QUARESMA *et al.*, 2005).

4.10 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS POR IMUNOHISTOQUÍMICA

A detecção de antígenos virais por Imunoistoquímica (IHQ) foi realizada pelo sistema da peroxidase de acordo com os procedimentos descritos por Hsu e

colaboradores (1981), utilizando soros homólogos anti-VILH e anti-VROC, produzidos na SEARB/IEC (item 4.3). Os antígenos específicos identificados foram semi-quantificados por campo microscópico usando uma escala de 0 a 4, sendo que: 0 = ausência de antígenos; 1 = presença de uma a duas células expressando antígenos virais; 2 = presença de 3-5 células expressando antígenos virais; 3 = presença de 6-10 células expressando antígenos específicos; e 4 = presença de mais de 10 células expressando antígenos específicos (QUARESMA et al., 2006).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL

Os estoques produzidos foram equivalentes a 10^a e 4^a passagem do VROC (SP H 34675) e VILH (BE H 7445), respectivamente, em camundongos albinos suíços recém-nascidos. Observou-se que os animais infectados pelo VROC adoeciam no 2º dia p.i., e os animais inoculados pelo VILH apresentaram sinais de doença no 4º dia p.i. Os sinais de doença foram os mesmos para ambos os vírus e se caracterizaram por paralisia, tremores e prostração.

O VROC e o VILH apresentaram títulos em camundongos suíços recém-nascidos expressos em Log₁₀DL₅₀/0,02 mL respectivamente de 9,8 e 9,6.

5.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMAGLUTINAÇÃO

Os soros coletados durante a cinética apresentaram anticorpos inibidores da hemaglutinação a partir do 5º dia p.i., seguindo de forma crescente até o título máximo detectado no 15º dia p.i. para ambos os vírus em estudo, após esse evento os anticorpos diminuem até 45 dias p.i., permanecendo sem muita alteração no título de anticorpos até o final do experimento (quatro meses p.i.). Os níveis de anticorpos obtidos nesses soros estão demonstrados no quadro 2 e nas Figuras 6 (A) e (B).

Dia/hora p.i.	VROC	VILH
1º dia p.i	0	0
2º dia p.i	0	0
3º dia p.i	0	0
4º dia p.i	0	0
5º dia p.i	480	320
6º dia p.i	640	320
7º dia p.i	640	400
15º dia p.i	1.280	12.800
30º dia p.i	960	1.280
45º dia p.i	640	1.280
60º dia p.i	640	640
75º dia p.i.	800	3.200
90º dia p.i	480	1.280
105º dia p.i	640	800
120º dia p.i	480	640

Quadro 2: Título de Anticorpos IH no soro de hamsters.

Legenda: p.i. : pós-inoculação

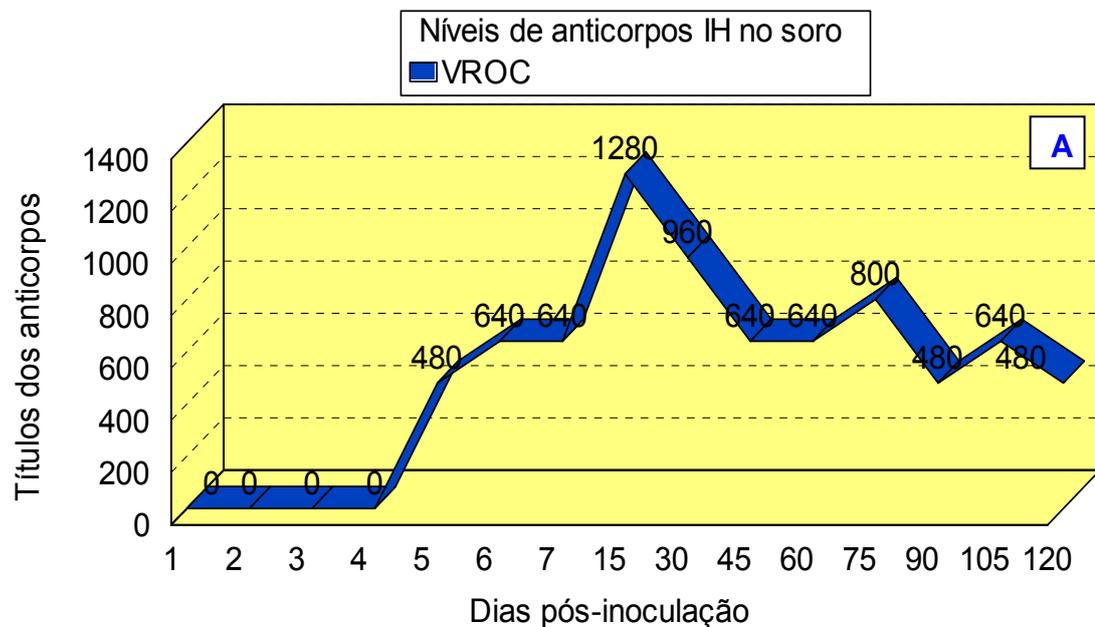


Figura 6: (A) Níveis de anticorpos específicos para o VROC nos soros de hamsters.

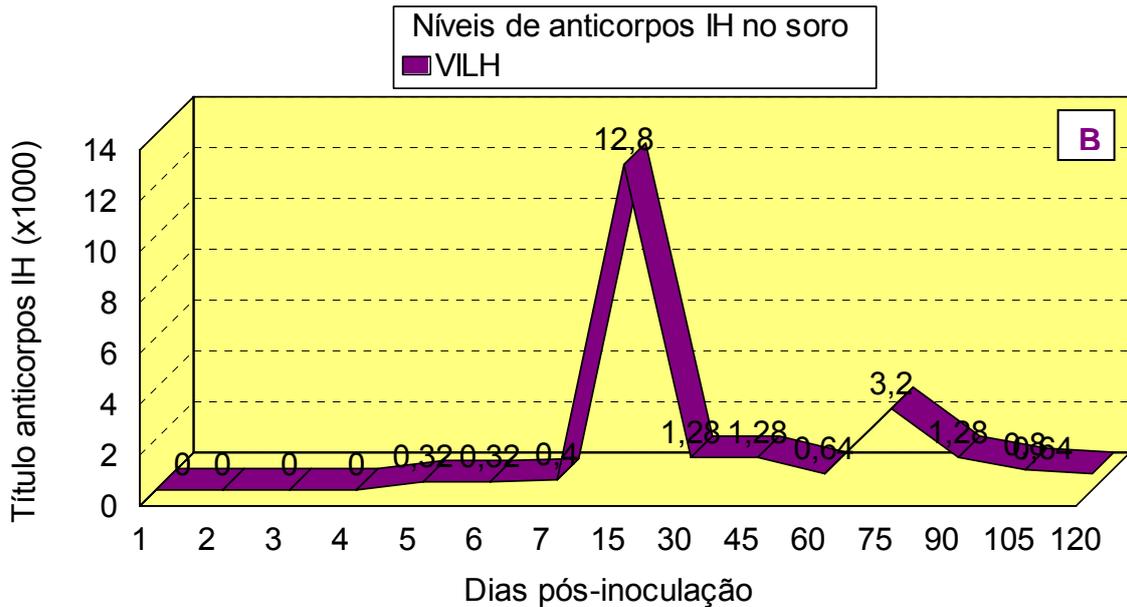


Figura 6: (B) Níveis de anticorpos específicos para o VILH nos soros de hamsters.

5.3 ISOLAMENTO VIRAL EM CÉLULAS VERO

Amostras de órgãos, sangue, soro e urina dos hamsters coletados durante a cinética e inoculados em células VERO produziram ECP, que foi caracterizado pela destruição da monocamada celular formando espaços devido à morte das células (figura 7(B) e (C)). O início do ECP tornou-se visível em torno do 3º dia de infecção. Posteriormente esse efeito se espalhou por toda monocamada até destruí-la em torno do 8º dia de infecção. O mesmo não foi visto no controle negativo (células VERO não infectadas) (Figura 7 (A)). As amostras coletadas durante a cinética, que produziram ECP em célula VERO estão demonstradas nos quadros 3 e 4.

Amostras VROC	1 dia p.i.	2 dias p.i.	3 dias p.i.	4 dias p.i.	5 dias p.i.	6 dias p.i.	7-120 dias p.i.
Fígado	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-	-
Rim	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Baço	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Pulmão	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Coração	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-
Cérebro	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-
Sangue	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-	-
Soro	ECP	ECP	ECP	-	-	-	-
Urina	n.i.	ECP	ECP	ECP	-	-	-

Quadro 3: Amostras coletadas durante a cinética do VROC que produziram ECP em célula VERO.

Legenda: (ECP) amostra produziu efeito citopático, (-) amostra não produziu efeito citopático, (n.i.) amostra não inoculada.

Amostras VILH	1 dia p.i.	2 dias p.i.	3 dias p.i.	4 dias p.i.	5 dias p.i.	6 dias p.i.	7 dias p.i.	15 dias p.i.	30-120 dias p.i.
Fígado	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-	-	-	-
Rim	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Baço	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Pulmão	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Coração	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-	-
Cérebro	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	ECP	-
Sangue	ECP	ECP	ECP	-	-	-	-	-	-
Soro	ECP	ECP	ECP	-	-	-	-	-	-
Urina	n.i.	ECP	ECP	-	ECP	ECP	n.i.	-	-

Quadro 4: Amostras coletadas durante a cinética do VILH que produziram ECP em célula VERO.

Legenda: (ECP) amostra produziu efeito citopático, (-) amostra não produziu efeito citopático, (n.i.) amostra não inoculada.

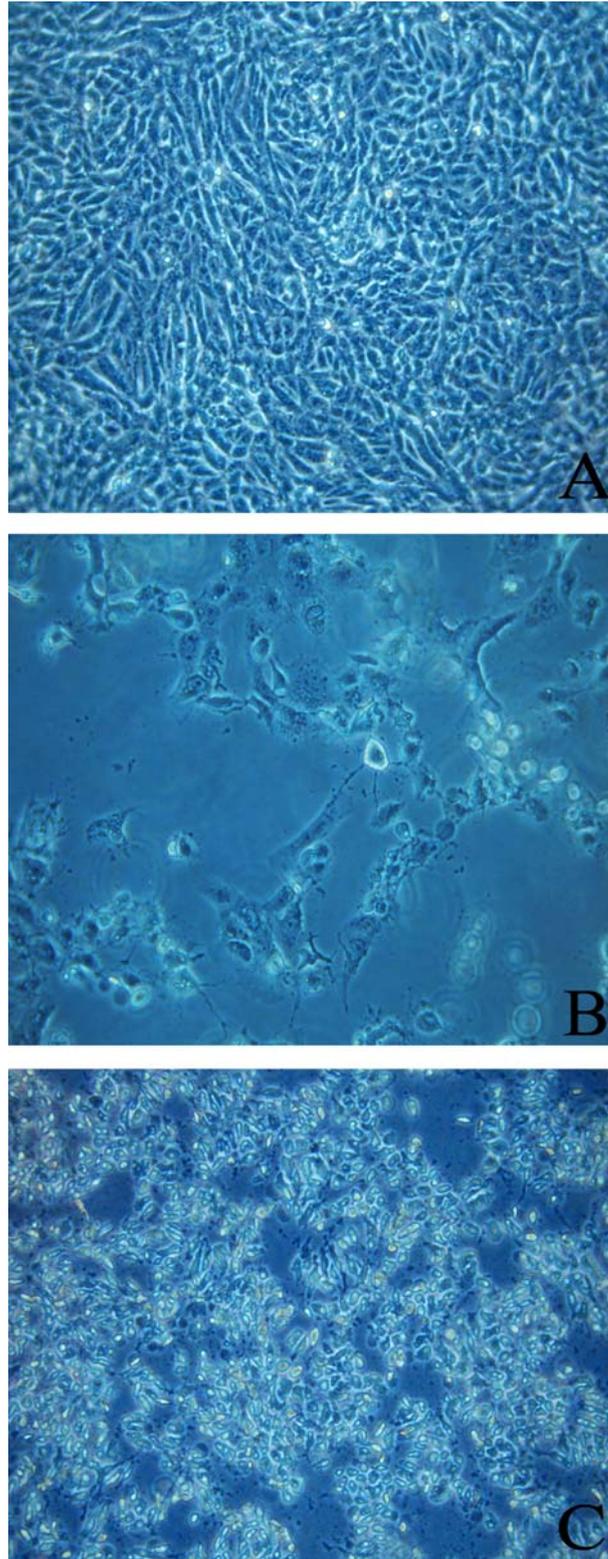


Figura 7: Cultura de células VERO; (A) Células não infectadas cultivadas em garrafa; (B) Células cultivadas em garrafa infectadas com VROC, mostrando ECP (4 dias p.i. em células); (C) Células cultivadas em garrafa infectadas com o VILH, mostrando ECP (3 dias p.i. em células) (200X).

5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Nas amostras biológicas de hamsters infectados com o VROC, coletadas com 1 dia p.i., somente no sangue foi possível confirmar replicação viral em célula VERO. Já com 2 dias p.i., foi possível detectar antígenos do VROC nos sobrenadantes de inoculadas células com amostras de sangue, soro, urina, fígado, rim, baço, pulmão e cérebro infectadas. Os sobrenadantes de células infectados com tecidos, sangue e soro, coletadas com 3 dias p.i. durante a cinética do VROC, apresentaram resultados positivos com o soro homólogo do mesmo. Somente sobrenadantes de células infectadas com soro e urina coletados com 4 dias p.i. em hamsters com o VROC, foram negativos para detecção de antígenos virais. Em sobrenadantes de células infectadas com soro, sangue, urina e amostra de fígado coletadas após 5 dias p.i. em hamsters, durante a cinética do VROC, não foram encontrados antígenos virais. Nos sobrenadantes de células infectadas com amostras de coração e cérebro coletados com 6 dias p.i. em hamster, foram detectados antígenos do VROC. Os materiais biológicos coletados com sete até 120 dias p.i. em hamsters com VROC, e inoculados em células apresentaram resultado negativo para detecção de antígenos do VROC (figura 8 (A e B)) (quadro 5).

Todas as amostras coletadas durante a cinética com o VILH, com 1 dia p.i. em hamsters, e inoculadas em células VERO apresentaram antígenos para o mesmo. Apenas no sobrenadante de célula infectada com urina, coletadas com 2 dias e 3 dias p.i. em hamsters, não foi observado antígenos do VLIH. Os sobrenadantes de células inoculados com amostras de sangue, soro e urina coletados com 4 dias p.i. com VILH em hamsters foram negativos para detecção de

antígeno viral. Foi possível observar antígenos do VILH nos sobrenadantes de células inoculados com amostras de rim, baço, pulmão, coração, cérebro e urina coletados com 5 e 6 dias p.i. em hamsters infectados. Os sobrenadantes de células infectados com rim, baço, pulmão, coração e cérebro, coletados com 7 dias p.i. em hamsters durante a cinética do VILH, apresentaram resultado positivo para o soro homólogo do mesmo. Amostra de cérebro coletada com 15 dias p.i. com VILH em hamster, e inoculada em sobrenadantes de célula foi o único a apresentar antígenos para o VILH. Todos os materiais biológicos entre 30 e 120 dias p.i. com VILH em hamsters infectados apresentaram resultado negativo para detecção de antígenos virais (figura 8 A e C) (quadro 6).

Amostras VROC	1 dia p.i.	2 dias p.i.	3 dias p.i.	4 dias p.i.	5 dias p.i.	6 dias p.i.	7-120 dias p.i.
Fígado	-	++	+++	+++	-	-	-
Rim	-	+++	+++	+++	++	-	-
Baço	-	+++	+++	+++	+++	-	-
Pulmão	-	++	+++	+++	+++	-	-
Coração	-	-	++	+++	+++	+	-
Cérebro	-	+	++	+++	+++	++	-
Sangue	+++	+++	+++	++	-	-	-
Soro	-	++	++	-	-	-	-
Urina	n.i.	+++	-	-	-	-	-

Quadro 5: Título do VROC, conforme a porcentagem de antígenos virais observado.

Legenda: Escala de um a três cruzes: (-) negativo, (+) 25% do campo, (++) 50% do campo, (+++) 75%do campo; (n.i.) não inoculada

Amostras VILH	1 dia p.i.	2 dias p.i.	3 dias p.i.	4 dias p.i.	5 dias p.i.	6 dias p.i.	7 dias p.i.	15 dias p.i.	30-120 dias p.i.
Fígado	++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Rim	++	++	++	++	++	+++	+++	-	-
Baço	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Pulmão	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-
Coração	+	+++	++	++	+++	+++	++	-	-
Cérebro	++	++	++	++	+++	+	+	++	-
Sangue	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Soro	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
Urina	n.i.	-	-	-	+	+	n.i.	-	-

Quadro 6: Título do VILH, conforme a porcentagem de antígenos virais observado.

Legenda: Escala de um a três cruzes: (-) negativo, (+) 25% do campo, (++) 50% do campo, (+++) 75%do campo; (n.i.) não inoculada.

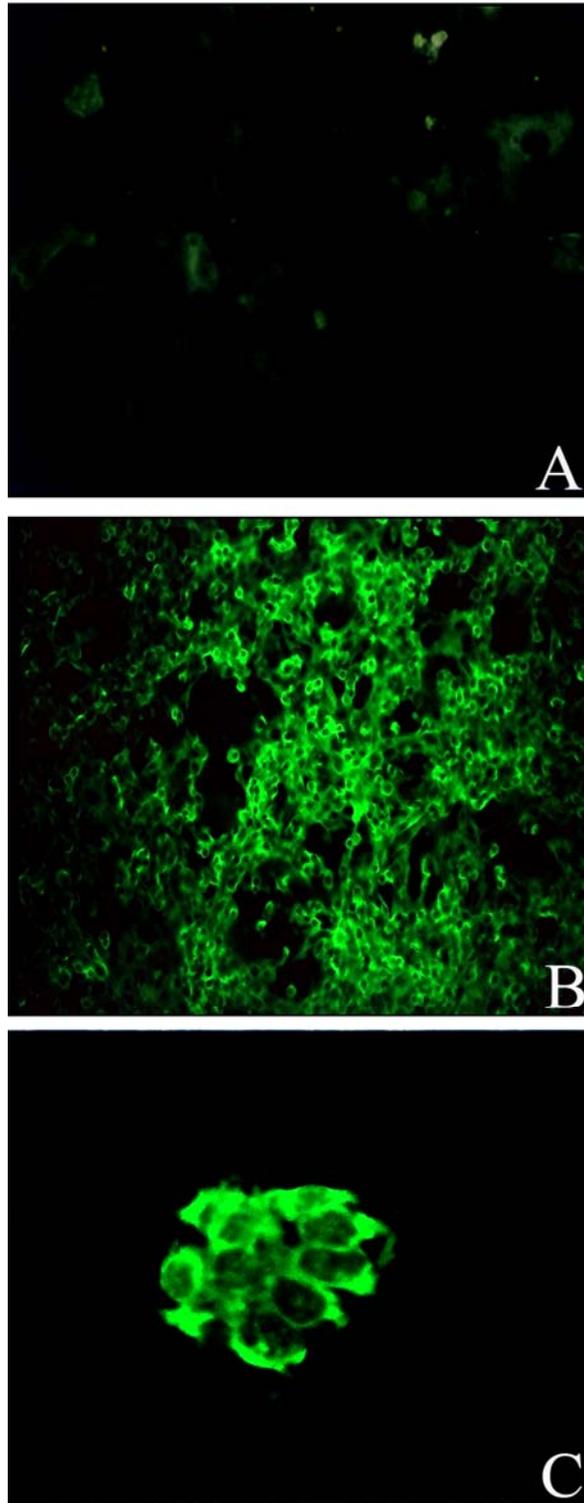


Figura 8: (A) Imunofluorescência indireta de células VERO não infectadas (400X); (B) Imunofluorescência indireta de células VERO infectadas com o VROC com 4 dias p.i. (200X); (C) Imunofluorescência indireta de células VERO infectadas com o VILH com 4 dias p.i. (400X).

5.5 CURVA VIRÊMICA

A qRT-PCR usando pares de primers se mostrou altamente específica para os VROC e o VILH. Na curva de dissociação a T_m encontrada dos amplicons específicos se situaram na taxa de 79.8-82.0 °C (Figura 9 A e B). As cepas mostraram um CT de 14,65 a 25,23 para o VROC e 16.20 a 27.78 para o VILH (Figura 10 A e B).

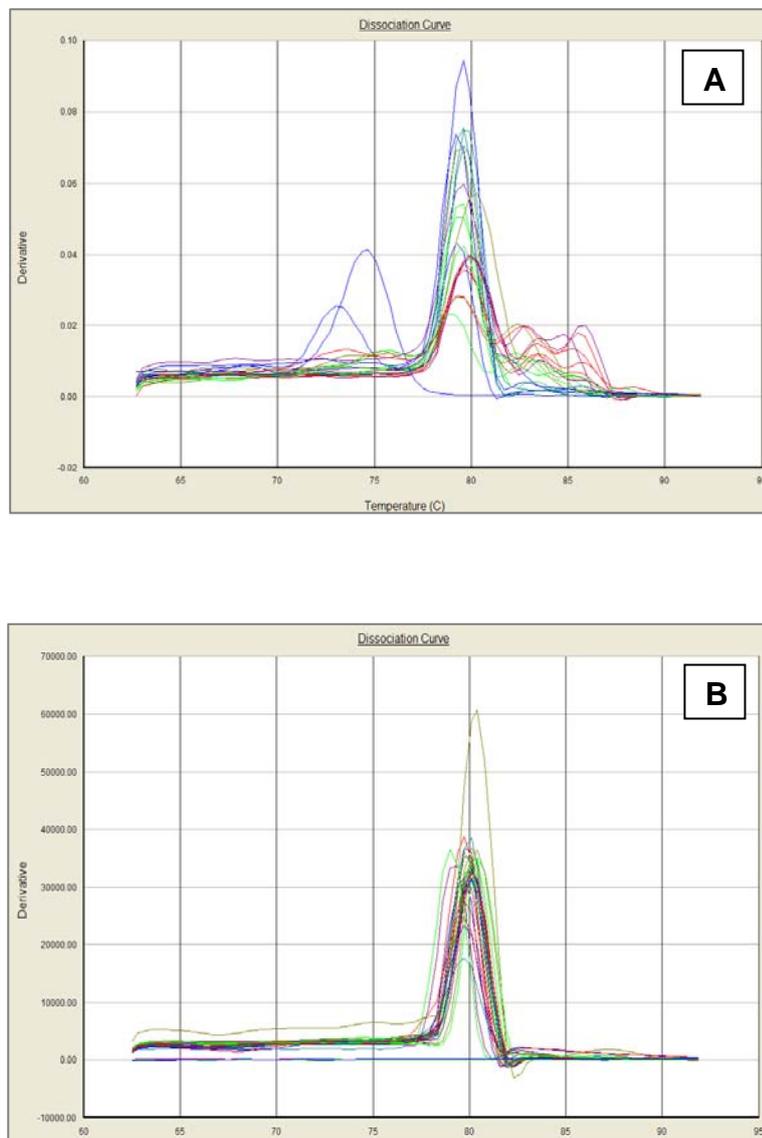


Figura 9: Curva de dissociação (A) Temperatura do “amplicon” correspondente ao VROC; (B) Temperatura do “amplicon” correspondente ao VILH.

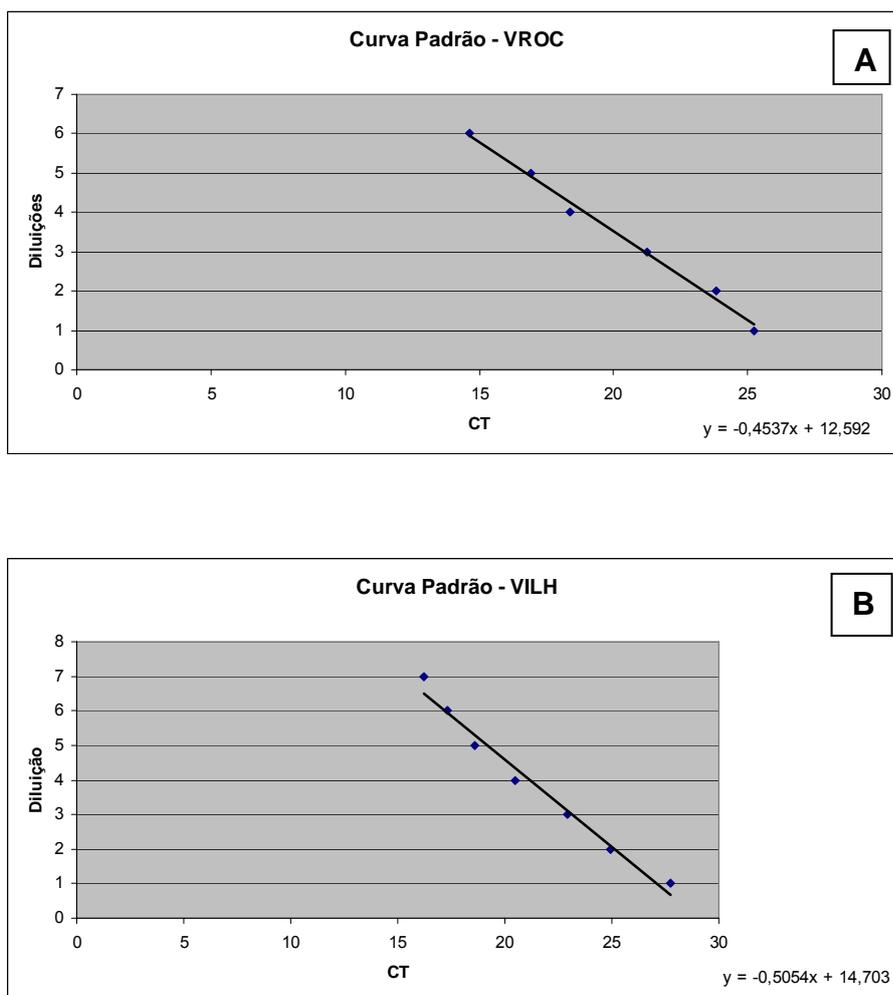
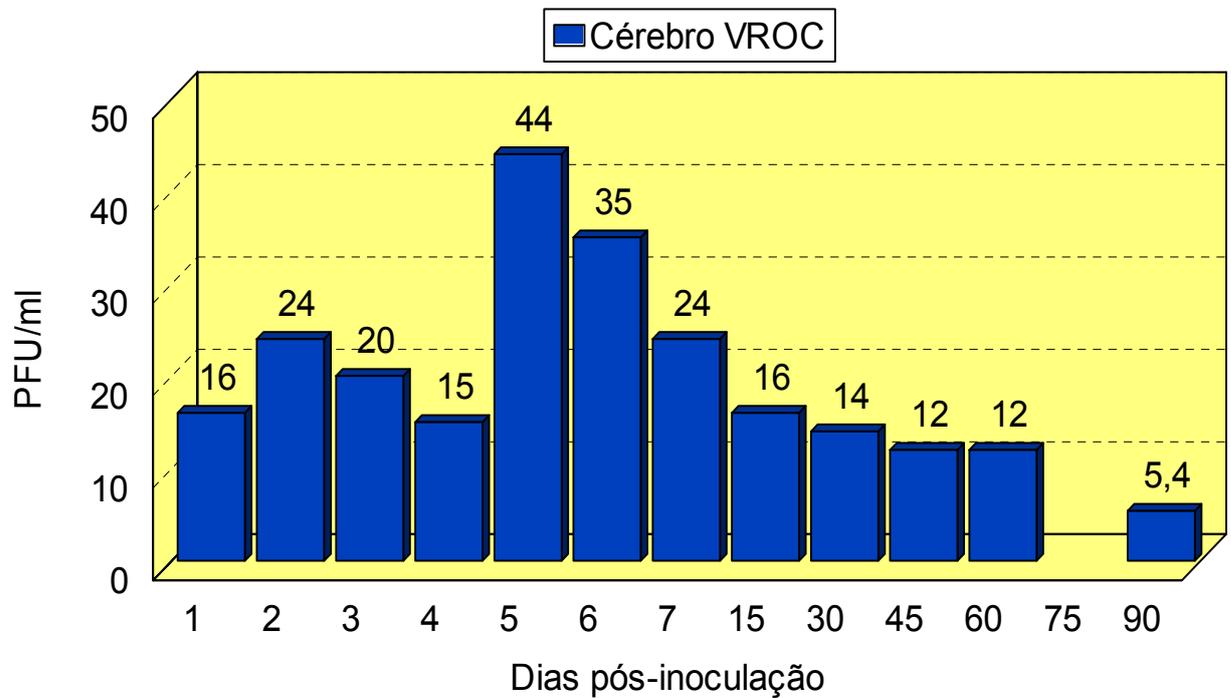
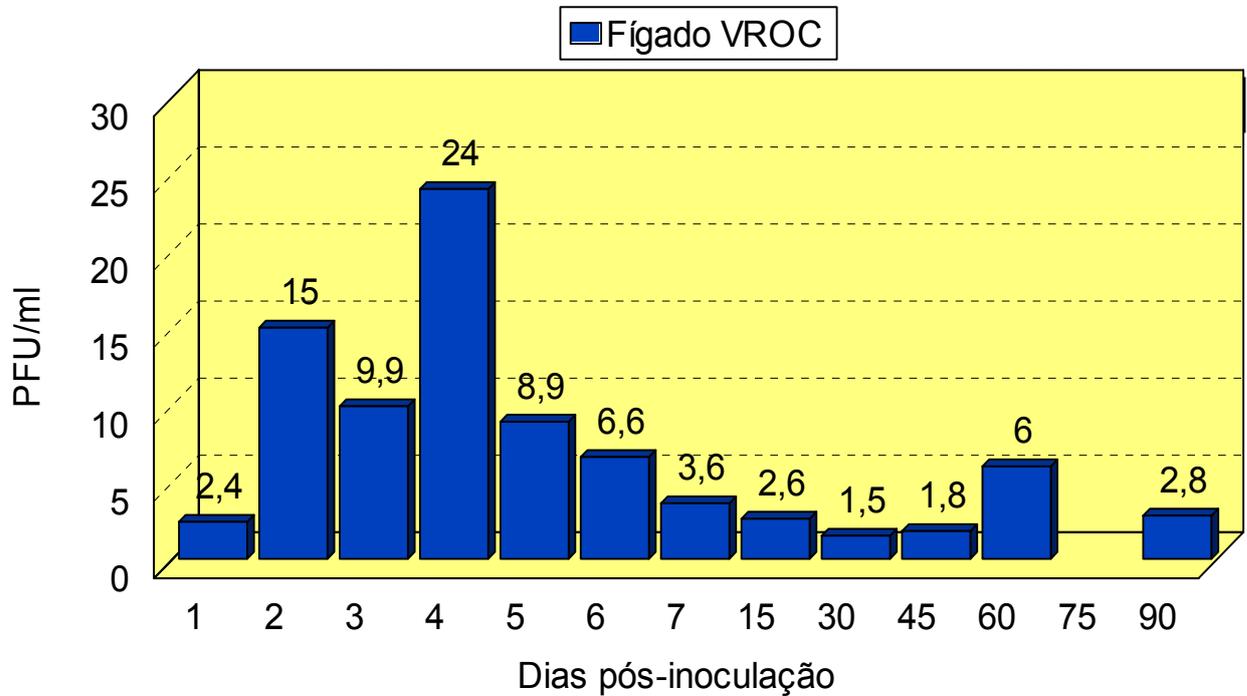


Figura 10: (A) Curva Padrão do VROC; (B) Curva Padrão do VILH.

A equação de curva padrão encontrada nos controles positivos dos VROC e VILH, foi comparado com o valor de CT encontrado nas amostras para que desse modo fosse quantificado de forma relativa à carga viral das mesmas em PFU/mL.

Nas amostras de cérebro, fígado e sangue coletadas durante a cinética do VROC, foram detectados presença de RNA viral a partir do 1º dia p.i., sendo observada carga viral de forma crescente, até o título máximo encontrado com 4 dias p.i. para as amostras de fígado e 5 dias p.i. para as amostras de cérebro e sangue; após esse evento houve diminuição na carga viral permanecendo quase sem

alteração até o final do experimento (três meses p.i. em hamsters) (Figura 11 (A), (B) e (C)).



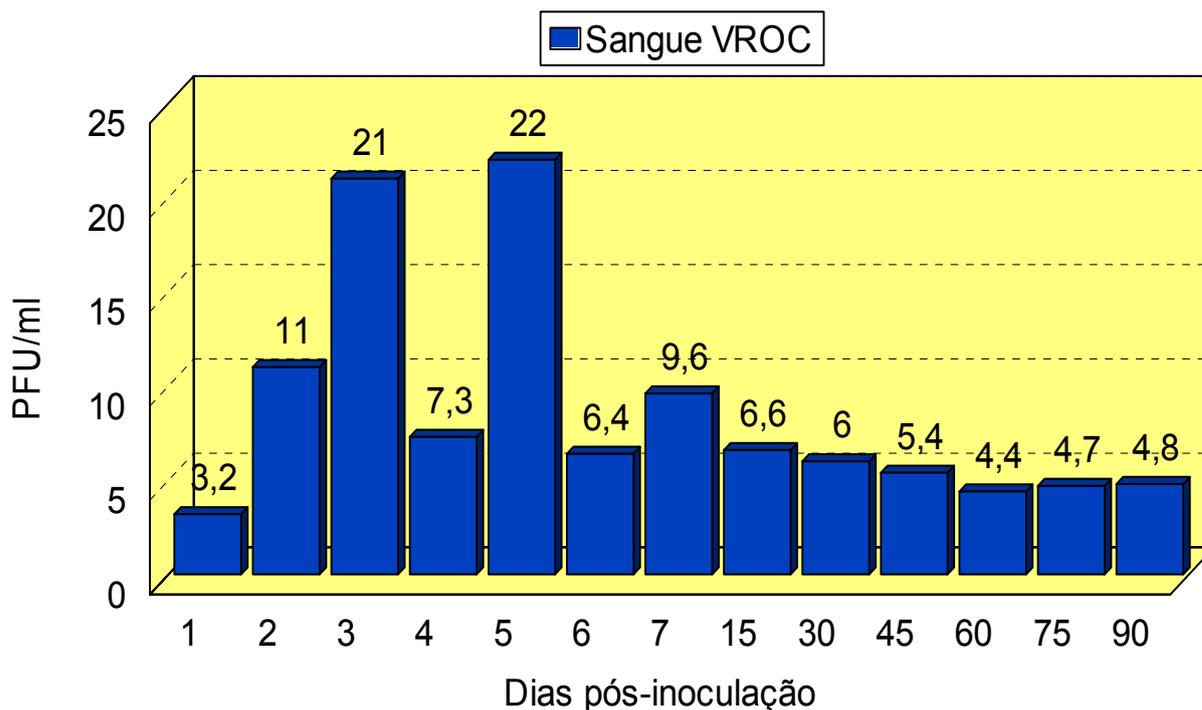
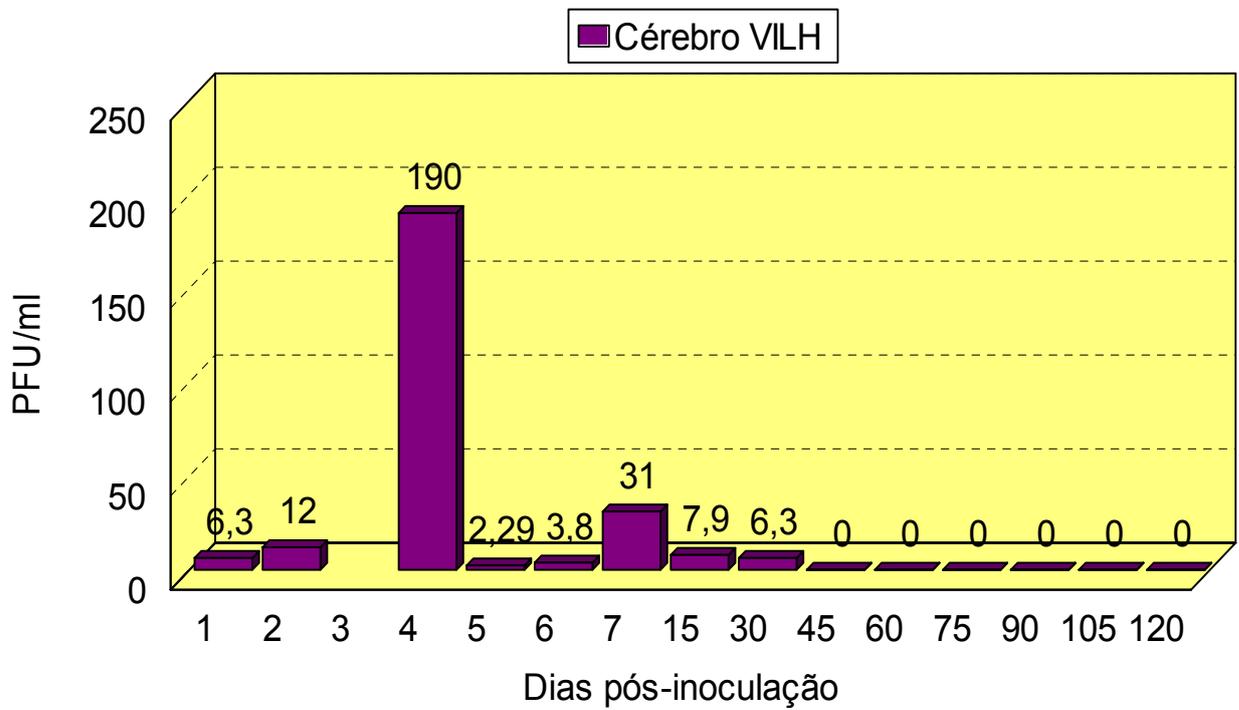
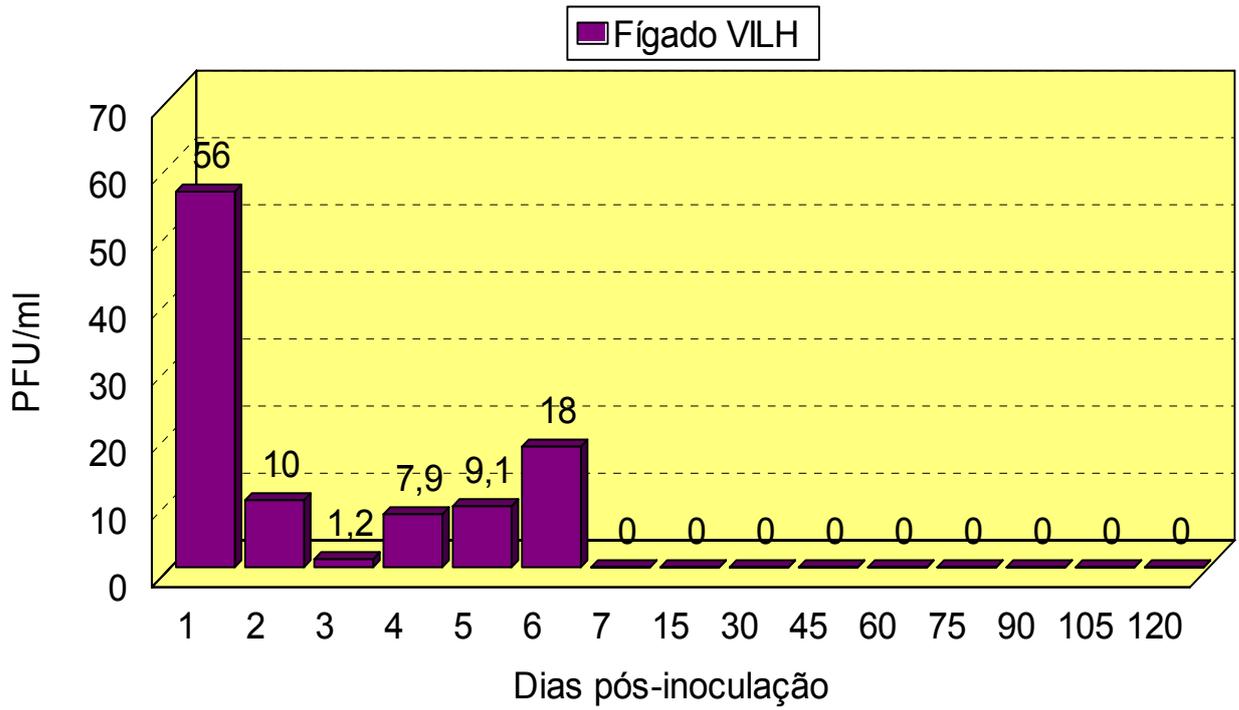


Figura 11: (A) Carga viral do VROC no fígado de hamsters em PFU/mL; (B) Carga viral do VROC no cérebro de hamsters em PFU/mL; (C) Carga viral do VROC no sangue de hamsters em PFU/mL.

As amostras de fígado coletadas durante a cinética do VILH apresentaram detecção do genoma viral a partir do 1º dia p.i., sendo nesse dia detectado o título máximo, após o 2º dia p.i. até o 6º dia p.i. não houve muita alteração na quantificação viral, que desaparece após o 7º dia p.i. (Figura 12 A); Nas amostras de cérebro coletadas dos animais infectados com o VILH, foi observado carga viral a partir do 1º dia p.i., sendo o título máximo detectado no 4º dia p.i., a partir do 5º dia p.i. a carga viral detectada diminuiu e permaneceu sem muitas alterações até 30 dias p.i. (figura 12 B). A viremia no sangue foi detectada por qRT-PCR a partir do 1º dia p.i. em hamsters, e a carga viral máxima foi observada no 2º dia p.i.; após esse evento houve uma diminuição no título viral permanecendo com pouca alteração até 15 dias p.i. (figura 12 C).



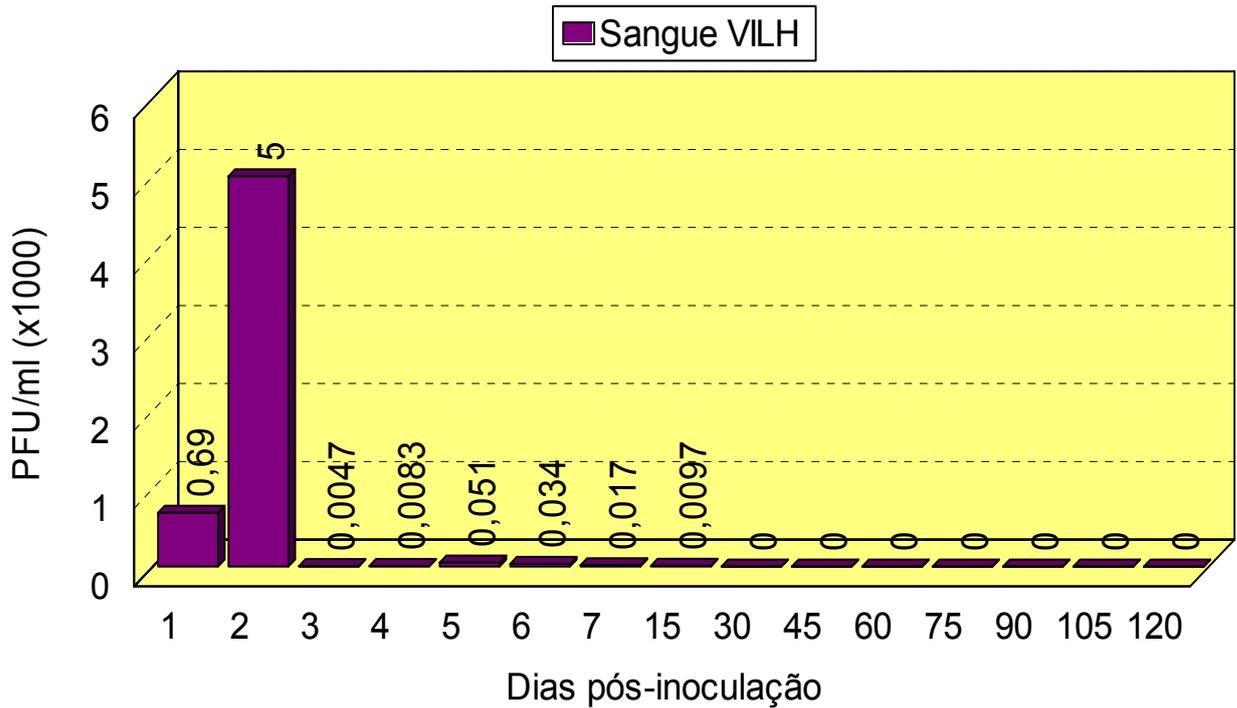


Figura 12: (A) Carga viral do VILH no fígado de hamsters em PFU/mL.; (B) Carga viral do VILH no cérebro de hamsters em PFU/mL; (C) Carga viral do VILH no sangue de hamsters em PFU/mL.

5.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E DETECÇÃO ANTIGÊNICA

5.6.1 Caracterização das alterações Imuno-histopatológicas observadas na infecção pelo VROC.

Na infecção pelo VROC em hamsters dourados, as lesões teciduais (figuras 13 e 14) foram mais evidentes no fígado, pulmão, rim e cérebro (itens A, B, C e D), muito embora tenham sido observadas pequenas alterações no coração e baço, caracterizadas por edema acompanhado por infiltrado mononuclear entre os

espaços que permeiam os miocardiócitos; e hiperplasia do baço, dando um aspecto reacional.

A) Fígado

O fígado dos hamsters infectados pelo VROC, durante análise histológica mostrou tumefação celular que, por vezes, adquiriu aspecto de balonização com espaços-porta, mostrando discreto a moderado infiltrado mononuclear e freqüentes hepatócitos necrosados ou apoptóticos (figura 13 B). Não há evidências de colestase e tampouco há predileção por área específica de Rápaport. Os espaços-porta mostram-se edemaciados e preenchidos por infiltrado de linfócitos e plasmócitos que, por vezes, se insinuam adentrando os sinusóides hepáticos. Alterações regenerativas são observadas a partir do 10º dia p.i. e se estenderam até após o 30º dia p.i. As alterações observadas no parênquima hepático sofreram considerável atenuação após 15 dias p.i., porém persistiram mesmo após 30 dias p.i., só que em menor intensidade.

A presença de antígeno viral (figura 15 B) revelada pela imunohistoquímica no fígado dos hamsters infectados pelo VROC foi intensa nos períodos compreendidos entre o 1º ao 15º dia p.i., decaindo entre o 16º e 30º dia p.i., e ficando em quantidades mínimas, porém persistente de 30 dias p.i. em diante.

B) Pulmão

O pulmão infectado pelo VROC mostrou congestão de tabiques alveolares e espessamento dos mesmos às custas de edema, congestão e infiltrado

mononuclear (figura 13 H e I), observando-se ainda áreas de franca pneumonite com focos de necrose. Não se observa entretanto, áreas de condensação franca do parênquima que possa caracterizar quadro histopatológico de pneumonia e tampouco, áreas ou focos de hemorragia. Esse quadro teve seu pico no 7º dia p.i., mantendo-se até o 15º dia p.i., melhorando, substancialmente, entre 15 e 30 dias p.i. e mantendo-se com alterações mínimas após 30 dias p.i..

O antígeno viral foi identificado no parênquima pulmonar dos animais infectados pelo VROC e teve quantitativamente o mesmo comportamento observado no fígado, com maior intensidade de imunomarcção até 15 dias p.i., decaindo daí em diante e mantendo-se persistentemente após 30 dias p.i..

C) Rim

Observou-se nos rins dos hamsters infectados, congestão glomerular (figura 13 E) associada a edema e focos de necrose tubular associado a leve infiltrado de linfócitos e plasmócitos que se distribui principalmente no interstício do parênquima renal (Figura 13 F). Foi observado tumefação celular a nível de túbulos, além de discretos focos de necrose tubular associados. As alterações tiveram pico com 7 dias p.i., e mantiveram-se até 15 dias p.i., melhorando a partir do 17º dia p.i., e mantendo-se o processo inflamatório e a tumefação de células tubulares após 30 dias p.i..

A imunomarcção para antígenos virais no rim (figura 15 D) infectado pelo VROC mostrou positividade franca no parênquima renal, com pico no 7º dia p.i.,

mantendo-se em intensidade até o 15º dia p.i., a partir daí decaindo e mantendo-se em níveis discretos após os 30 dias p.i..

D) Cérebro

Foram observados no SNC dos animais infectados pelo VROC congestão e infiltrado mononuclear ao nível das meninges (figura 14 B) associados a edema intraparenquimatoso que se caracteriza pela presença de vacuolização ao redor dos corpos neuronais e gliose cerebral (figura 14 D). Os espaços de Virchow-Robin não apresentam alterações e tampouco observou-se gliose cerebral ou nódulos gliais. Essas alterações sofreram seu pico máximo entre 7 e 8 dias p.i., mantendo-se até 15 dias p.i., atenuaram-se entre 16 e 30 dias p.i., e persistiram após 30 dias p.i..

No cérebro dos hamsters infectados com o VROC, a marcação pela imunohistoquímica para o antígeno viral (figura 15 E) se mostrou positiva no parênquima cerebral, e a intensidade de antígenos foi mais proeminente entre 1 e 7 dias p.i., persistindo em níveis baixos após 15 dias p.i. em diante (figura 18).

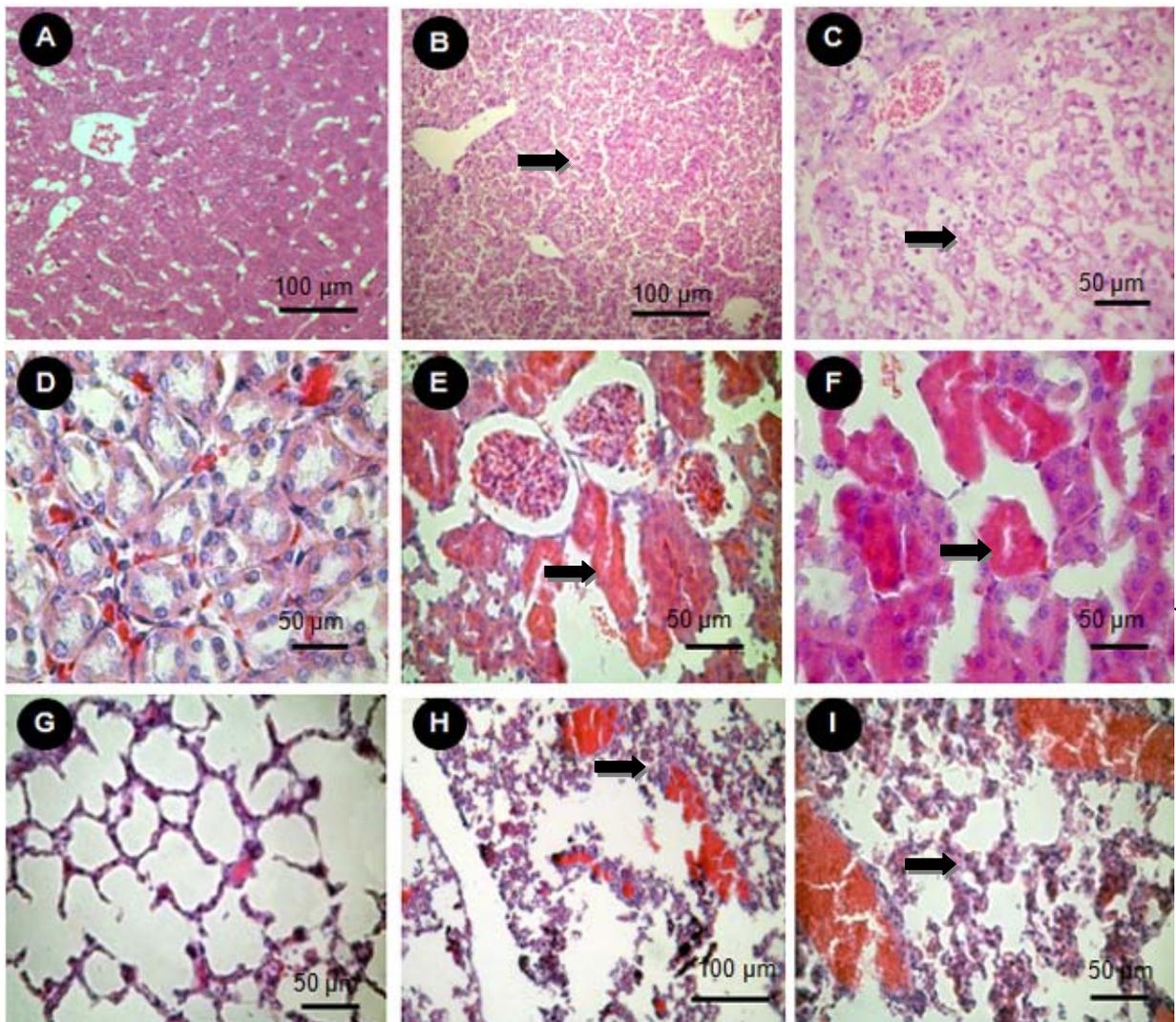


Figura 13: Micrografia por HE de hamsters infectados com o VROC (A) Fígado de animal controle; (B) Fígado apresentando balonização de hepatócitos e espaços porta com infiltrado mononuclear (seta), 75 dias p.i.; (C) Fígado mostrando algumas das células hepatocitárias com núcleos reativos/regenerativos ou de aspectos picnóticos (seta), 75 dias p.i.; (D) Rim de animal controle; (E) Tecido renal mostrando alterações caracterizadas pela congestão de glomérulos (seta), 75 dias p.i.; (F) Tecido renal mostrando epitélio tubular com tumefação e infiltrado inflamatório nuclear no interstício (seta), 75 dias p.i.; (G) Pulmão de animal controle; (H) Tecido pulmonar com espessamento das paredes alveolares devido à congestão, edema e infiltrado mononuclear (seta), três dias p.i.; (I) Tecido pulmonar evidenciando as alterações (seta) do item H, três dias p.i..

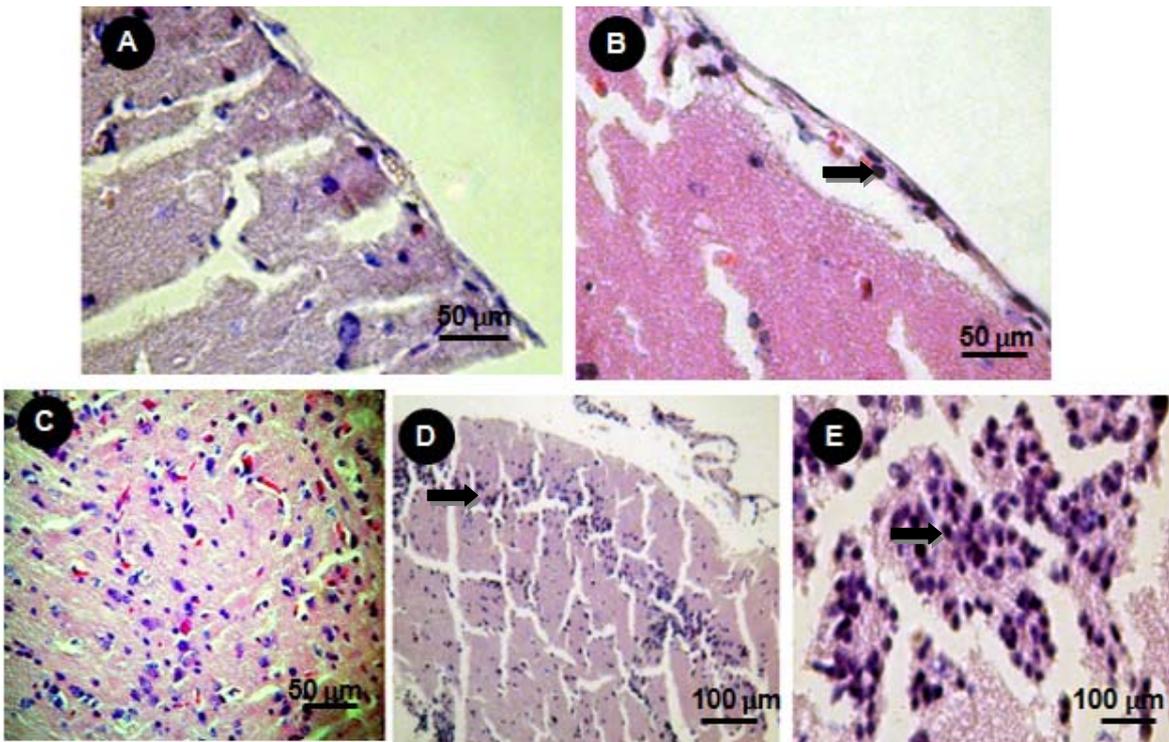


Figura 14: Micrografia por HE de hamsters infectados com o VROC Histopatologia (A) SNC apresentando meninge de animal controle; (B) SNC apresentando meninge com infiltrado inflamatório mononuclear e congestão (seta), três dias p.i.; (C) SNC de animal controle; (D) SNC mostrando alterações caracterizadas por gliose reativa e edema (seta), 75 dias p.i.; (E) SNC apresentando gliose reativa (seta), 75 dias p.i..

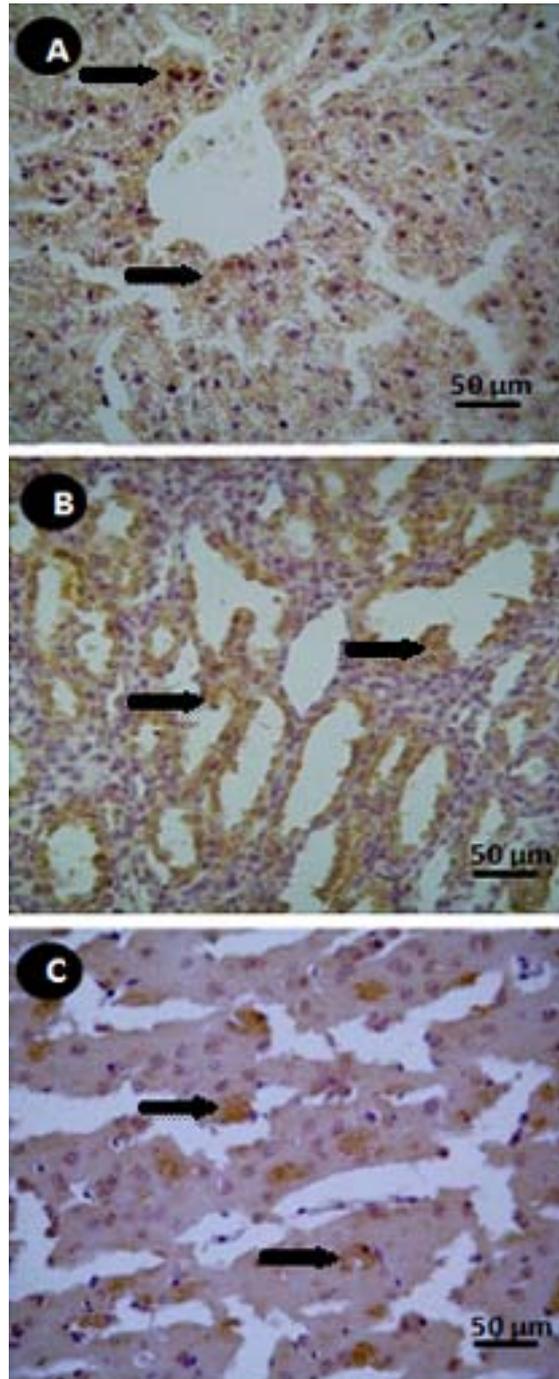


Figura 15: Fotomicrografia da análise imunohistoquímica de órgãos de hamsters dourados infectados com o VROC mostrando resultado positivo através da marcação acastanhada (seta) nos tecidos: (A) hepáticos, 6 dias p.i.; (B) renal, 5 dias p.i.; (C) nervoso, 5 dias p.i..

5.6.2 Semiquantificação das lesões teciduais e detecção antigênica na infecção pelo VROC.

Semiquantificação foi realizada nas amostras de fígado (figura 16), rim (figura 17) e cérebro (figura 18), coletados durante a cinética do VROC, órgãos onde as alterações foram mais proeminentes. Análise comparativa demonstrou que cérebro e fígado foram os órgãos com lesões mais intensas, e por um período de tempo maior. Os parâmetros estabelecidos para quantificar as alterações observadas foram: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

As lesões observadas no tecido hepático (balonização, apoptose e necrose), durante os primeiros sete dias variaram de intensa a muito intensa, acompanhadas por intenso processo inflamatório, intensa detecção do antígeno e regeneração variando de leve a moderada. No período de 8 a 15 dias p.i., a quantidade das lesões, da inflamação e detecção de antígenos permaneceram muito intensas, mas foi observado um aumento gradativo de regeneração tecidual que se completou após 30 dias p.i.; Tanto as lesões quanto a detecção de antígeno começam a diminuir de intensidade a partir do 16º dia p.i., entretanto a inflamação permanece intensa até o 30º dia p.i., sendo observada sua diminuição após esse período (figura 16).

Na primeira semana, as lesões observadas pelo tecido renal (tumefação, congestão e necrose) e o processo inflamatório variaram de intensa a muito intensa, sendo acompanhados por intensa detecção de antígeno. Do 8º até o 15º dia p.i. as lesões diminuíram variando de moderada a intensa, com intenso processo

inflamatório e detecção de antígenos. A partir do 16º dia p.i., todas as alterações observadas diminuíram gradativamente de intensidade até o final do experimento (figura 17).

No tecido nervoso, alterações como gliose permaneceram leve por toda a cinética, já outros como edema, congestão, inflamação e detecção antigênica variaram de intensa a muito intensa nos primeiros 15 dias p.i., após esse período ocorreu diminuição nessas alterações, que então variaram de moderada a leve (figura18).

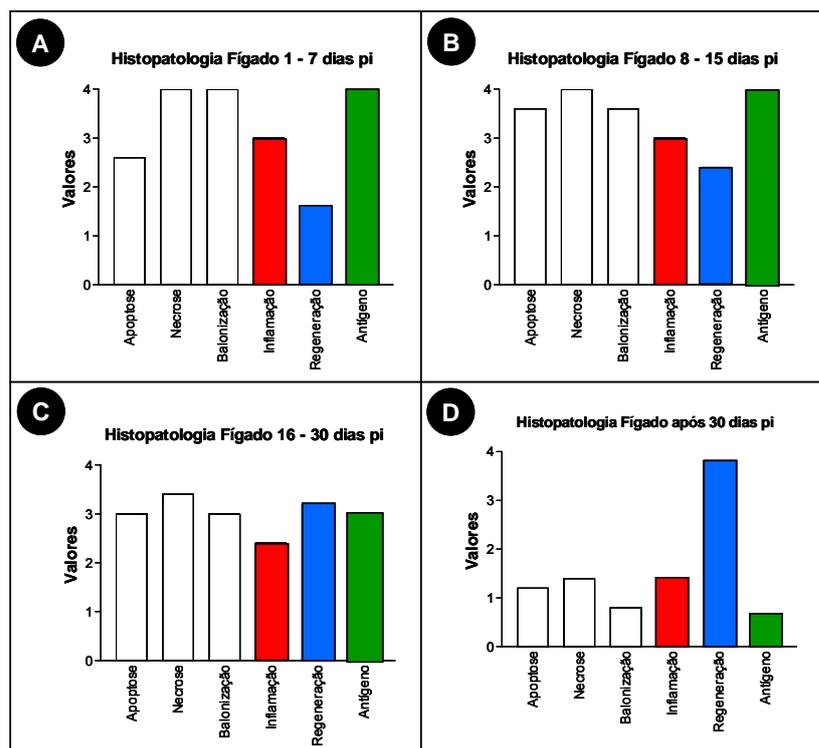


Figura 16: Semiquantificação das alterações do fígado na infecção pelo VROC; (A) Semiquantificação do 1º ao 7º dia p.i.; (B) Semiquantificação do 8º ao 15º dia p.i.; (C) Semiquantificação do 16º ao 30º dia p.i.; (D) Semiquantificação após o 30º dia p.i..
 Legenda: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

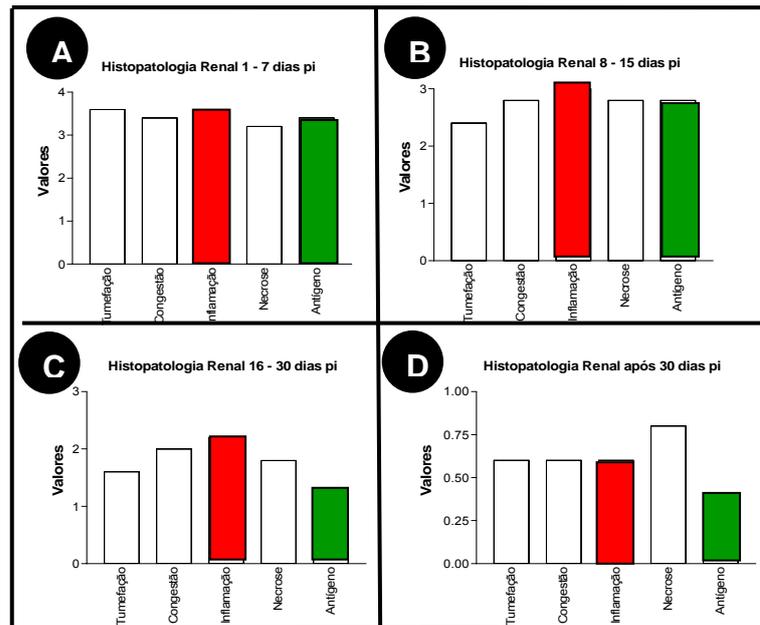


Figura 17: Semiquantificação das alterações do tecido renal, na infecção pelo VROC; (A) Semiquantificação do 1º ao 7º dia p.i.; (B) Semiquantificação do 8º ao 15º dia p.i.; (C) Semiquantificação do 16º ao 30º dia p.i.; (D) Semiquantificação após o 30º dia p.i. Legenda: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

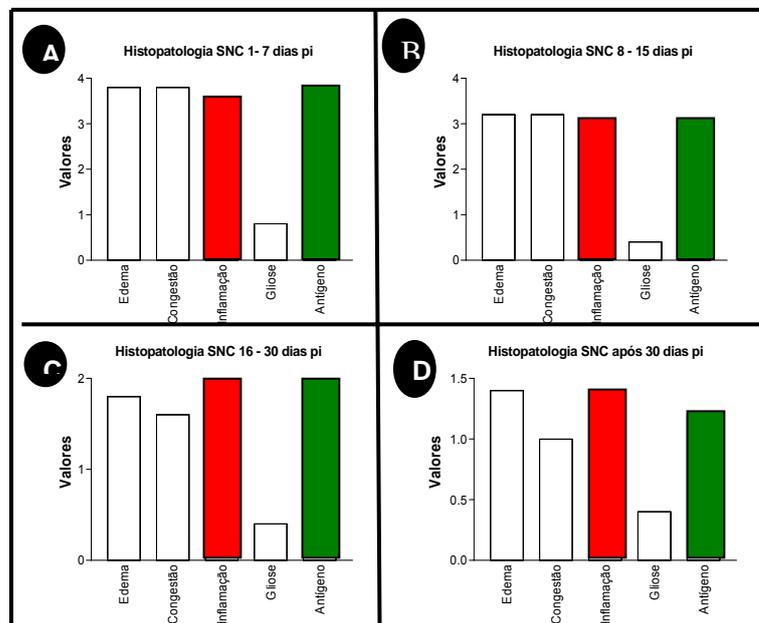


Figura 18: Semiquantificação das alterações do tecido nervoso, na infecção pelo VROC; (A) Semiquantificação do 1º ao 7º dia p.i.; (B) Semiquantificação do 8º ao 15º dia p.i.; (C) Semiquantificação do 16º ao 30º dia p.i.; (D) Semiquantificação após o 30º dia p.i. Legenda: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

5.6.3 Caracterização das alterações Imuno-histopatológicas observadas na infecção pelo VILH.

Na infecção pelo VILH em hamsters dourados, as lesões teciduais foram mais evidentes no fígado, pulmão, rim e cérebro (Figura 19 A, B, C e D), embora tenham sido observadas pequenas alterações no coração e baço, caracterizadas por edema acompanhado por infiltrado mononuclear entre os espaços que permeiam os miocardiócitos; e hiperplasia do baço, dando um aspecto reacional.

A) Fígado

Secções histológicas de fígado (figura 19 B) inoculados com o VILH mostraram tumefação celular e freqüentes hepatócitos necrosados ou apoptóticos, com espaços-porta mostrando moderado infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, não se observando alterações de veia, artéria e canalículo biliar. Não há evidências de colestase e tampouco há predileção por área específica de Rapaport. Além disso, o ácino mostra hipertrofia de células de Kupffer. Alterações regenerativas são observadas a partir do 6º dia p.i. e se estendem até o 30º dia p.i., e são principalmente representadas por regeneração do tipo dupla-placa. As alterações observadas no parênquima hepático sofreram considerável atenuação após o 15º dia p.i., e atenuaram-se consideravelmente até o 30º dia p.i., e inclusive em algumas áreas desaparece completamente.

O fígado dos hamsters infectados pelo VILH demonstrou presença de antígeno viral (figura 20 B) revelado pela imunohistoquímica e foi intensa nos

períodos compreendidos entre 1º ao 15º dia p.i., com pico no 7º dia, decaindo a partir daí até o 30º dia p.i., com desaparecimento quase que completo do antígeno viral no 30º dia p.i..

C) Pulmão

No pulmão inoculado com o VILH foi observado congestão de tabiques alveolares e espessamento dos mesmos a custa de edema, congestão e infiltrado mononuclear, com áreas de franca pneumonite e focos de necrose discreta (figura 19 D). Não se observa entretanto, áreas de condensação franca do parênquima que possam caracterizar quadro histopatológico de pneumonia e tampouco áreas ou focos de hemorragia. Esse quadro teve seu pico entre 5 e 6 dias p.i., mantendo-se até cerca de 15 dias p.i., melhorando substancialmente entre 15 e 30 dias p.i..

O antígeno viral foi identificado no parênquima pulmonar dos animais infectados pelos VILH (figura 20 D) e teve quantitativamente o mesmo comportamento observado no fígado, com presença de maior intensidade de imunomarcção até 15 dias p.i., decaindo daí em diante e praticamente desaparecendo com 30 dias p.i..

D) Rim

No rim dos animais infectados pelo VILH observou-se congestão glomerular associada a edema e focos de necrose tubular associado a leve infiltrado de linfócitos e plasmócitos que se distribuem principalmente no interstício do

parênquima renal. Também foi observado tumefação celular no nível de túbulos, além de discretos focos de necrose tubular associados. As alterações tiveram pico no 6º dia p.i., e mantiveram-se até o 15º dia p.i., melhorando a partir daí e se mantendo discretas até o 30º dia p.i..

No rim a imunomarcação para antígenos virais do VILH (figura 20 E) mostrou positividade franca do parênquima, com pico no 7º dia p.i., essa imunomarcação manteve-se em intensidade até o 15º dia p.i., a partir daí decai de intensidade e desaparece quase por completo no 30º dia p.i..

E) Cérebro

No cérebro dos hamsters infectados pelo VILH foram observados congestão e infiltrado mononuclear ao nível das meninges associados a edema intraparenquimatoso que se caracteriza pela presença de vacuolização ao redor dos corpos neuronais e gliose cerebral (figuras 19 E e F). Os espaços de Virchow-Robin não apresentaram alterações e tampouco se observaram gliose cerebral ou nódulos gliais. Essas alterações sofreram seu pico máximo entre 4 e 6 dias p.i., e mantiveram-se até o 15º dia p.i., atenuando entre o 16º e 30º dias p.i., ressalta-se que alterações mínimas foram observadas no 30º dia p.i..

A marcação de imunohistoquímica para o antígeno viral no SNC dos hamsters infectados pelo VILH mostrou positividade no parênquima cerebral (figura 20 F) e a intensidade de antígenos foi mais proeminente entre 1 e 6 dias pi, persistindo em níveis baixos do 15º dia p.i. em diante.

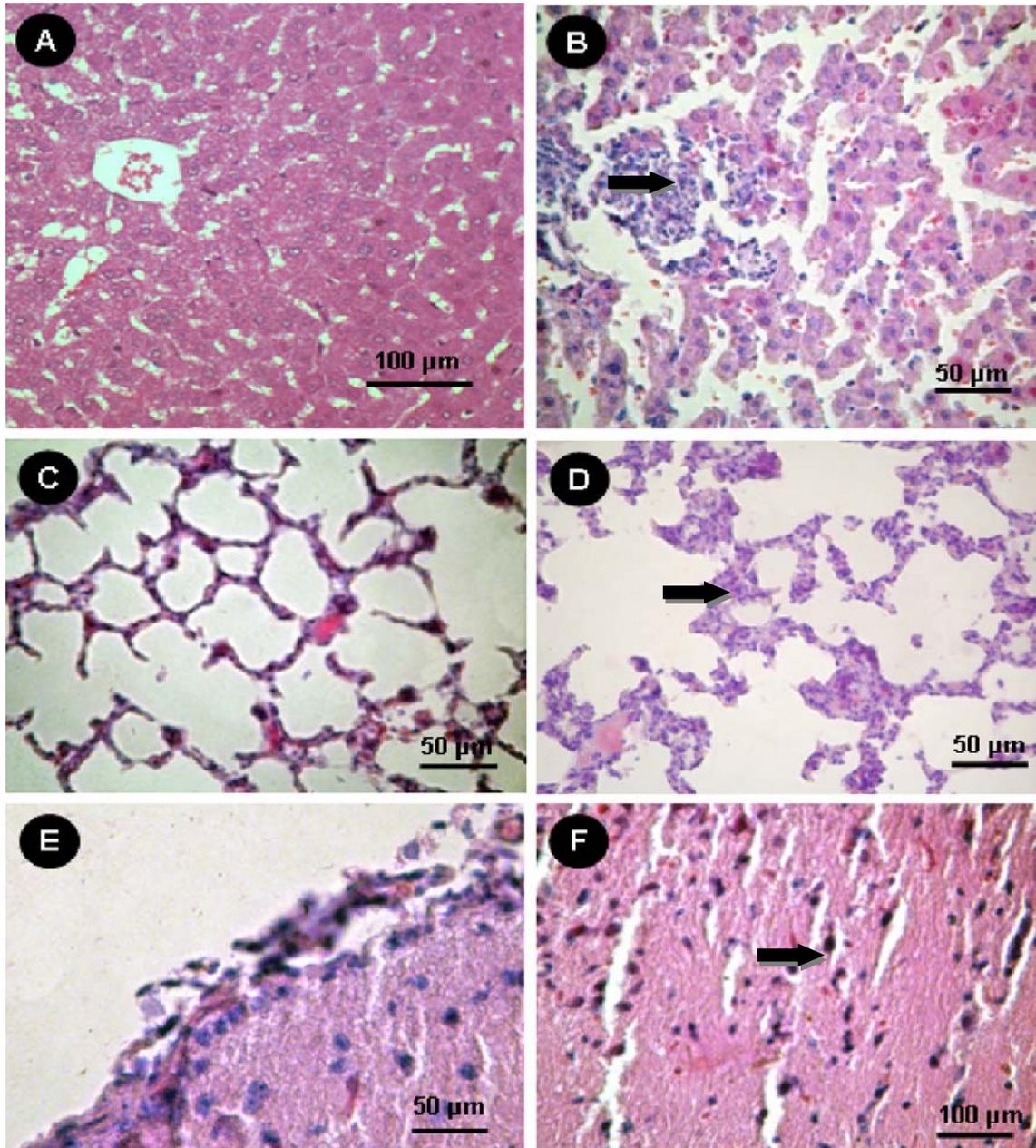


Figura 19: Micrografia por HE de hamsters infectados com o VILH (A) Fígado de animal controle (B) Fígado de animal infectado, apresentando infiltrado mononuclear evidente em meio ao qual se observa acino hepático com hepatócitos balonizados (tumefeito) e capilares sinusóides com presença de congestão (seta), 15 dias p.i.; (C) Pulmão de animal controle; (D) Tecido pulmonar com espessamento das paredes alveolares devido à congestão, edema e infiltrado mononuclear (seta), 15 dias p.i. (E) SNC apresentando meninge com infiltrado inflamatório mononuclear e edema, 15 dias p.i.; (F) SNC apresentando gliose reativa e edema (seta), 15 dias p.i..

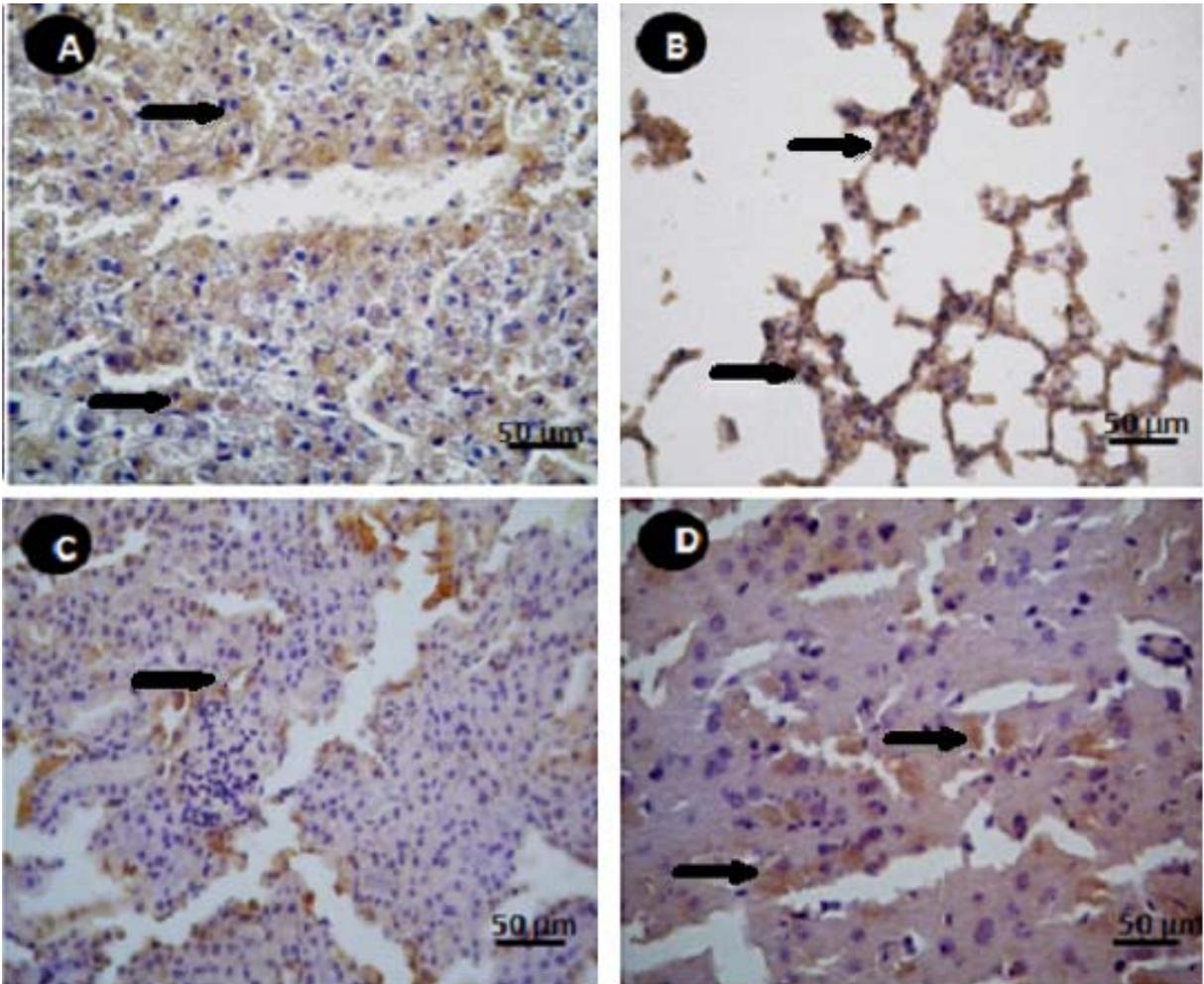


Figura 20: Fotomicrografia da análise imunohistoquímica de órgãos de hamsters dourados infectados com o VILH mostrando resultado positivo através da marcação acastanhada (seta) nos tecidos: (A) hepáticos, 4 dias p.i.; (B) pulmonar, 30 dias p.i.; (C) renal, 4 dias p.i.; (D) nervoso, 4 dias p.i..

5.6.4 Semiquantificação das lesões teciduais e detecção antigênica na infecção pelo VILH.

A análise de semiquantificação das lesões foi realizada nas amostras de fígado (figura 21), rim (figura 22) e cérebro (figura 23), coletados durante a cinética do VILH, órgãos onde as alterações foram mais proeminentes. Análise comparativa demonstrou que o cérebro foi o órgão com lesões mais intensas, e também por um

período de tempo maior. Os parâmetros para quantificação das alterações observadas foram iguais às usadas para o VROC (item 5.7.2).

As lesões observadas nos primeiros 15 dias p.i. no tecido hepático mostrou apoptose que variou de moderada a intensa; já lesões como necrose e balonização variaram de intensa a muito intensa, sendo acompanhadas por elevado processo inflamatório, com intensa detecção de antígeno; a regeneração do tecido variou de moderada a intensa. No período entre 16 e 30 dias p.i., as lesões, inflamação e detecção de antígenos diminuíram muito, enquanto a regeneração tecidual permaneceu muito intensa até o final do experimento. Após 30 dias p.i., não foi mais observado necrose nem a detecção de antígenos virais, sendo demonstrada quantidades mínimas de apoptose, balonização e inflamação (figura 21).

Do 1º ao 15º dia p.i., as lesões observadas pelo tecido renal (tumefação, congestão e necrose) e o processo inflamatório variaram de muito intensa a intensa, acompanhado por intensa detecção de antígeno. Após o 16º dia p.i. até o final do experimento houve uma diminuição progressiva em todas as alterações, que variaram de moderada a leve em intensidade (figura 22).

No tecido nervoso, alterações como gliose permaneceram com leve intensidade por toda a cinética, entretanto edema, congestão, inflamação e detecção de antígenos virais se mostraram intensas nos primeiros 15 dias p.i.; após esse período ocorreu diminuição na intensidade dessas alterações, que variaram de moderado a leve (figura 23).

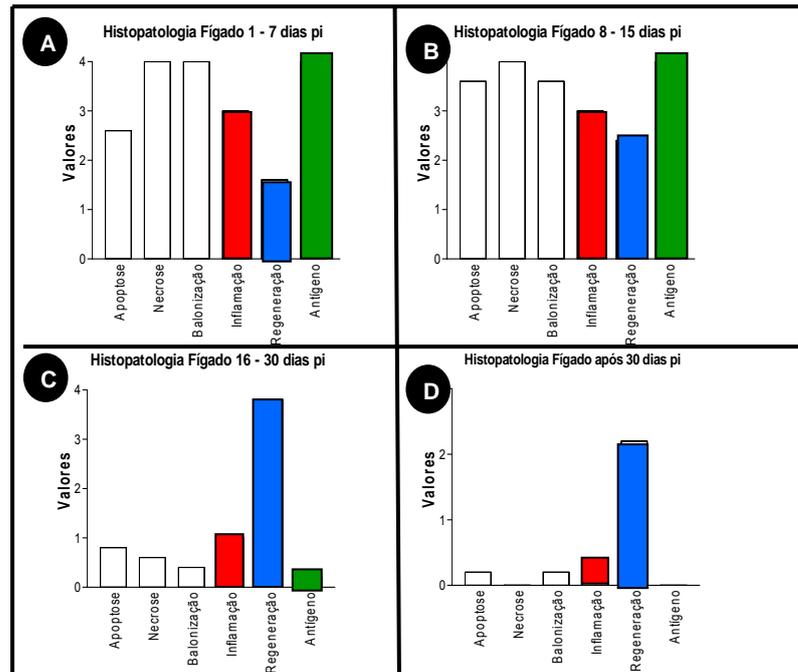


Figura 21: Semi-quantificação das alterações do tecido hepático, na infecção pelo VILH; (A) Semi-quantificação do 1º ao 7º dia p.i.; (B) Semi-quantificação do 8º ao 15º dia p.i.; (C) Semi-quantificação do 16º ao 30º dia p.i.; (D) Semi-quantificação após o 30º dia p.i. Legenda: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

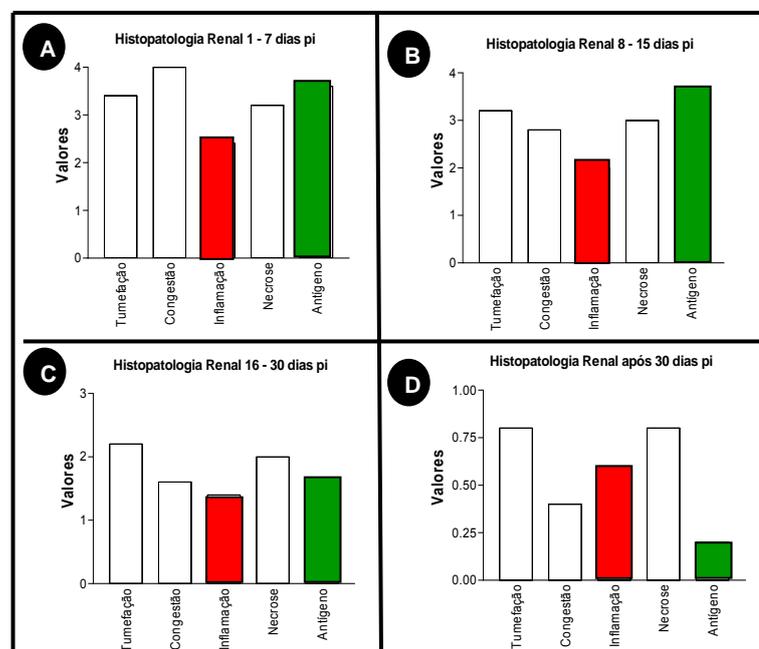


Figura 22: Semi-quantificação das alterações do tecido renal, na infecção pelo VILH; (A) Semi-quantificação do 1º ao 7º dia p.i.; (B) Semi-quantificação do 8º ao 15º dia p.i.; (C) Semi-quantificação do 16º ao 30º dia p.i.; (D) Semi-quantificação após o 30º dia p.i. Legenda: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

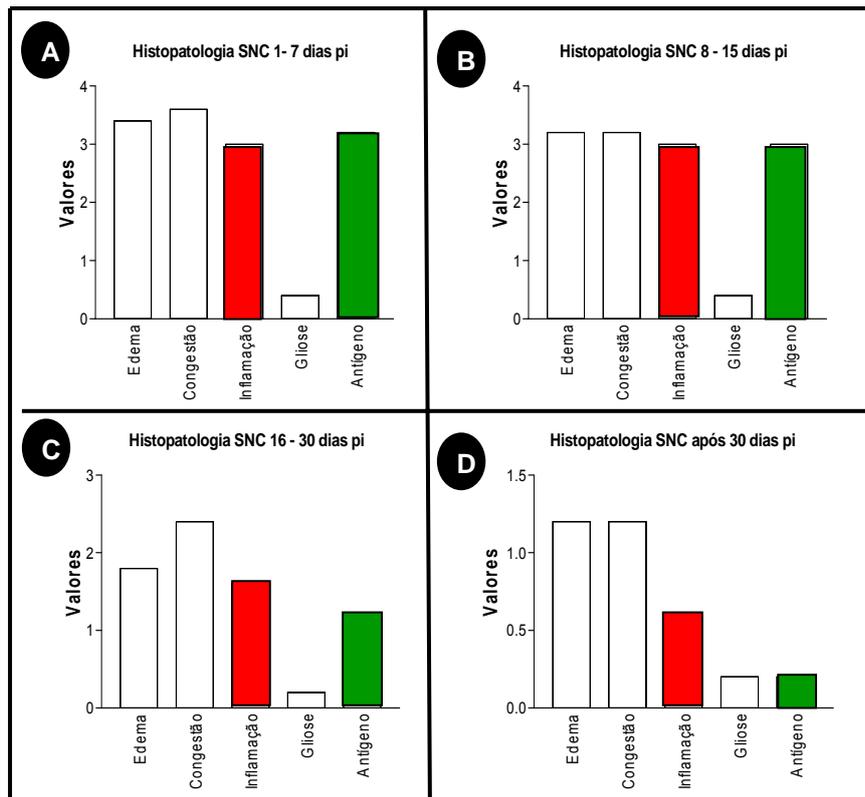


Figura 23: Semiquantificação das alterações do tecido nervoso, na infecção pelo VROC; (A) Semiquantificação do 1º ao 7º dia p.i.; (B) Semiquantificação do 8º ao 15º dia p.i.; (C) Semiquantificação do 16º ao 30º dia p.i.; (D) Semiquantificação após o 30º dia p.i. Legenda: 0= ausência; 1=leve; 2=moderada; 3=intensa; 4=muito intensa.

6 DISCUSSÃO

Os hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*) têm sido utilizados com muita frequência para estudos experimentais de patogenicidade e tratamento das infecções pelos flavivírus, pois esses animais representam um modelo seguro e de baixo custo para manutenção (TESH et al., 2001; XIAO et al., 2001). Até o momento, não se têm referências de estudos de persistência da infecção viral pelos VROC e VILH, usando como modelo experimental hamsters jovens. Nossos resultados demonstraram que esses animais são bons modelos experimentais para a infecção pelos flavivírus em estudo, corroborando com os resultados encontrados por Siirin e colaboradores (2007), Tesh e colaboradores (2005) e Tonry e colaboradores (2005), que demonstraram a suscetibilidade desses animais para infecção persistente pelos flavivírus VESL e VWN respectivamente.

Considerando que as cepas dos VROC e VILH selecionadas para inoculação em hamsters apresentavam títulos elevados em camundongos Suiços recém-nascidos, para que os mesmos sobrevivessem à cinética da infecção experimental por um período de quatro meses, foram realizadas diluições nas doses infectantes das cepas dos vírus em estudo, objetivando que alguns animais apresentassem infecção, mas sobrevivessem. Os animais sobreviventes não apresentaram sinais de doença, o que corrobora com resultados de alguns estudos, que fundamentam que a infecção classificada como persistência viral frequentemente é assintomática (OLDSTONE, 2002, 2005).

A curva imunológica observada para os VILH e VROC (figura 6 A e B), mostra que os níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação foram detectados a partir do 5º dia p.i. e foram similares aos resultados de Tesh e colaboradores, (2001); Xiao e colaboradores, (2001); Azevedo (2004) com estudos com o VFA, VWN e VILH, respectivamente. No nosso estudo, ambos os vírus apresentaram pico máximo do seu título com 15 dias p.i., após esse período houve uma diminuição gradativa que se manteve com pouca alteração até o final do experimento, isto talvez explique em parte a ocorrência da infecção persistente em hamsters.

O título máximo de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o VILH foi dez vezes maior que o observado para o VROC. Esse achado possivelmente explica a eliminação total do VILH após 30 dias p.i. inclusive por qRT-PCR, enquanto o VROC foi detectado durante três meses em alguns órgãos e no sangue. Durante estudo sobre infecção persistente experimental com o Vírus da *Coriomeningite Linfocítica* (LCMV) em ratos realizado por Oldstone (2002), foi observado que as células T CD8 estão envolvidas na eliminação do arenavírus. Embora as células T CD8 sejam as principais células efetoras para a eliminação do vírus na infecção aguda, técnicas genéticas “Knock-out” e estudo de reconstituição têm mostrado evidências de que células T CD4 são absolutamente necessárias para manutenção das atividades das células T CD8 na eliminação da infecção persistente (BATTEGAY et al., 1994; MATLOUBIAN et al., 1994; TISHON et al., 1995).

O cultivo viral em célula VERO tem sido usado frequentemente para o diagnóstico das arboviroses, já que as células VERO são permissíveis aos arbovírus. As amostras dos hamsters infectados coletadas durante a cinética e

inoculadas em células VERO resultaram, como esperado, na replicação viral de ambos os vírus em estudo, sendo as infecções confirmadas por IFI. Foi observada variação na quantificação e permanência de antígeno viral entre os dois vírus (tabelas 5 e 6), sendo o cérebro o órgão que apresentou detecção de antígenos virais por mais dias (seis dias p.i. para o VROC e 15 dias p.i. para o VILH) e em maior quantidade o que era esperado, pois ambos os vírus experimentais são considerados encefalitogênicos, no entanto, os resultados obtidos com o VILH sugeriram maior suscetibilidade desse vírus para replicação em célula VERO quando comparada com o VROC, pois a detecção de antígeno do VILH foi mais prolongada.

O VROC e o VILH desenvolveram viremia no sangue quando detectável com apenas 1 dia p.i. e esses resultados corroboram os dados obtidos no estudo de Azevedo (2004), Tesh e colaboradores (2001) e Xiao e colaboradores (2001), com os VILH, VFA e VWN, respectivamente. A detecção de antígeno viral nos sobrenadantes de cultivos de células infectadas com sangue pela técnica de IFI foi observada por no máximo quatro dias p.i., e que coincide com o início de detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação; este evento também foi observado por Tesh e colaboradores (2005) no estudo sobre infecção persistente pelo VWN em hamsters, que igualmente não detectaram viremia nesses animais após o 6º dia p.i., e anticorpos inibidores da hemaglutinação foram detectados, logo em seguida, a partir do 7º dia p.i.; isto provavelmente se deve, à presença dos anticorpos neutralizantes que se fixam ao vírus, formando imunocomplexos não permitindo a entrada do mesmo em novas células, evitando a replicação viral, e em seguida são eliminadas do organismo pelos mecanismos de defesa imune.

Embora em todos os sobrenadantes de células infectados com órgãos, sangue, soro e urina tenham mostrado a presença de partículas virais viáveis, mediante o isolamento confirmando a infecção e a replicação viral, através da positividade dos testes de IFI, não foi observado persistência viral nas células VERO por esta técnica. Ressalta-se entretanto, que a cultura direta dos órgãos infectados provavelmente não foi a melhor estratégia para observar persistência viral, essa evidência também foi feita por Xiao e colaboradores (2001) e Siirin e colaboradores (2007) em estudos com VWN e VESL, respectivamente. Esses autores sugerem que a técnica de co-cultivo é a mais apropriada para demonstração de persistência viral por flavivírus.

Todos os hamsters testados nos estudos citados acima tinham altos níveis de anticorpos neutralizantes quando foram sacrificados durante a cinética experimental. Esta seria uma provável explicação do porquê a cultura direta tenha raramente permitido isolar o vírus, pois é sabido que no momento da maceração dos fragmentos de órgãos, ocorre liberação de vírus intracelular, os quais podem entrar em contato com anticorpos presentes no sangue e fluidos intersticiais dos tecidos, reduzindo, desta forma, a sensibilidade deste método de estudo para demonstração de persistência viral (XIAO et al., 2001; TESH et al., 2005).

Tesh e colaboradores (2005) em estudo sobre infecção persistente pelo VWN também em hamsters dourados demonstraram que a maioria das amostras testadas de urina (onde não há o contato com anticorpos presentes no sangue) resultam na recuperação do vírus por cultura direta (célula VERO), observando entretanto, que nas amostras de tecido o VWN foi poucas vezes recuperado por

esse método. Um resultado que corrobora essa explicação é de que o isolamento do vírus no estudo supra mencionado foi três vezes maior pelo método de co-cultivo, pois a lavagem do tecido com tripsina-EDTA que ocorre durante o preparo do espécime, presumidamente elimina muitos ou todos os anticorpos neutralizantes, sem destruir o vírus intracelular, o qual seria subsequente liberado e amplificado no co-cultivo com a monocamada de célula VERO (TESH et al., 2005).

A urina tem mostrado ser um bom espécime clínico para isolar flavivírus e também para demonstrar a persistência viral em cultura direta de células VERO (SIIRIN et al., 2007; TONRY et al., 2005; TESH et al., 2005). Em nosso experimento se conseguiu isolar o vírus a partir da urina, o que mostra que a urina desses animais infectados são infecciosas. Ressalta-se, no entanto que nos estudos onde se demonstraram uma boa resposta de isolamento do vírus, a urina foi diluída em PBS antes da inoculação em célula VERO. Neste estudo, a urina foi inoculada diretamente, em uma proporção final de 1:50, em célula VERO, sendo que a toxicidade da urina pode ter influenciado nos resultados obtidos.

No teste de qRT-PCR foi possível detectar vírus na urina, mesmo em concentração muito pequena. Foram selecionadas para o VROC e VILH as três últimas amostras de urina que foi possível coletar durante a cinética experimental (30, 60 e 75 dias p.i., para o VROC e 15, 30 e 75 dias p.i. para o VILH), os resultados foram positivos para 30 e 60 dias p.i., com títulos de 1,1 e 0,67 PFU/mL, respectivamente, para o VROC e 30 dias p.i., 0,9 PFU/mL para VILH (dados não mostrados).

A *qRT-PCR* é uma técnica com excelente sensibilidade chegando a 99,09% (YONG et. al., 2007), e que é capaz de detectar o genoma do vírus mesmo inativo. Em todas as amostras testadas por esta técnica (sangue, fígado e cérebro), infectadas pelo VROC detectamos o vírus indicando a presença de persistência viral, sendo detectados RNA viral até o término do experimento (três meses). Por outro lado, para as amostras infectadas com VILH, apenas o cérebro apresentou persistência viral, sendo detectado RNA viral por até 30 dias p.i. A excelente sensibilidade desta técnica também foi observada quando comparado os resultados da mesma com os obtidos por IFI. De fato, a *qRT-PCR* foi muito mais sensível já que a IFI detectou antígenos virais por no máximo 15 dias p.i. nas amostras de sobrenadantes de células infectadas com cérebro coletados durante a cinética do VILH (tabela 6).

Pelo estudo histopatológico, foi possível observar que os VROC e VILH promoveram infecções pantrópicas de caráter inflamatório, causando lesões histológicas no SNC, fígado, rim, baço, pulmão e coração. A intensidade e amplitude das lesões teciduais variaram entre os diferentes órgãos acometidos e para os dois vírus em estudo. Entretanto, o tipo de lesão tecidual apresentado por cada órgão foi semelhante entre os dois vírus e corroboraram com o estudo sobre patogenicidade do VILH em Hamster jovens realizado por Azevedo (2004).

Alterações regenerativas e/ou evolução para persistência de alteração tecidual apresentaram características diferentes entre os órgãos acometidos para os dois vírus em estudo. As alterações observadas no parênquima hepático infectado pelos VROC e VILH sofreram considerável atenuação após 15 dias p.i., já outras

amostras de vísceras infectadas pelo VROC persistiram com alterações mesmo após 30 dias p.i., porém com menor intensidade. Por sua vez, as amostras infectadas pelo VILH diminuíram consideravelmente até 30 dias p.i., e em algumas áreas desapareceram completamente, enquanto no SNC observou-se atenuação das alterações histopatológicas entre 16 e 30 dias p.i. para ambos os vírus, persistindo alterações após 30 dias p.i. para espécimes infectados pelo VROC e com alterações mínimas observadas no 30º dia p.i. naqueles infectados pelo VILH. Esses resultados adicionados aos observados pelos ensaios de IHQ e seguindo o mesmo padrão com a técnica de *qRT-PCR* sugerem maior patogenicidade para o VROC quando comparada com o VILH em hamsters jovens, principalmente para o SNC. Esta observação é condizente com a gravidade da encefalite por VROC observada em humanos durante epidemia ocorrida no Estado de São Paulo (TIRIBA, 1975; IVERSSON, 1988).

O estudo histopatológico apresentou alterações de caráter inflamatório no rim para ambos os vírus em estudo. Este resultado aliado à detecção de antígenos virais no rim e RNA viral por *qRT-PCR* na urina por no mínimo 30 dias p.i. em hamsters, sugerem o rim como um órgão envolvido na resistência da infecção por flavivírus, corroborando os achados de Siirin e colaboradores (2007) que observaram nesses mesmos animais em estudo de infecção persistente por VESL, a ocorrência alterações nos tecidos renais, caracterizado por dilatação do túbulo renal com atrofia do epitélio tubular e raros focos de microcalcificação. Nesse mesmo estudo, aproximadamente metade dos hamsters continuaram apresentando infecção pelo VESL na urina por um prolongado período de tempo (SIIRIN et al., 2007).

Em fragmentos de baço e coração inoculados com os vírus em estudo (VROC e VILH), apesar de se ter observado replicação viral dos mesmos em células VERO e a ocorrência de alterações teciduais, não se conseguiu demonstrar a presença de antígenos virais por IHQ. Isto pode sugerir que a replicação viral em células VERO, assim como as lesões teciduais encontradas podem ser decorrentes da passagem do vírus por estes órgãos através do sangue, e que seria necessário a técnica de co-cultivo de células VERO para demonstrar a infecção viral persistente, ou ainda a utilização da técnica de *qRT-PCR*, como demonstrado para cérebro e fígado.

As alterações histopatológicas encontradas neste estudo nos fragmentos de órgãos coletados durante a cinética da infecção demonstraram que as lesões teciduais para ambos os vírus em experimento foram mais evidentes no SNC seguido pelo fígado, pois apresentarem alterações teciduais durante todo o experimento (quatro meses) no SNC para os dois vírus em estudo, e no fígado o mesmo foi observado apenas nas amostras infectadas com o VROC, sendo esses resultados evidenciados também pelos ensaios de IHQ e *qRT-PCR*.

A intensa Inflamação na meninge associada a edema intraparenquimatoso observada nas amostras de cérebro infectadas por ambos os vírus em estudo, sugere a penetração desses vírus no SNC pela via hematogênica, que seriam introduzidos, através das meninges possivelmente pela passagem de células do sistema imune infectadas. Foi observado neste estudo além do tropismo pelo SNC, o viscerotropismo, sendo o fígado a víscera que apresentou maior comprometimento tecidual, exibindo lesões mais intensas. De fato, Dias (1986)

relatou que o fígado depois do SNC, parece ser o órgão alvo mais freqüente de agressão pelos arbovírus, incluindo os flavivírus, em camundongos albinos suíços recém nascidos.

Hamsters infectados experimentalmente com diversos outros arbovírus desenvolvem lesões hepáticas importantes, que podem resultar na morte desses animais (TESH et al., 2001; XIAO et al., 2003). Neste estudo observou-se na análise quantitativa que as lesões no fígado apresentaram padrão semelhante às causadas pelo VFA com diferença na intensidade das lesões. Com efeito, o padrão observado com VROC e VILH quando comparados com os estudos de Quaresma e colaboradores (2005) que em análise histopatológica em fígados de humanos infectados com VFA, demonstraram alterações caracterizadas por necrose lítica e apoptose acompanhados por um moderado infiltrado inflamatório predominantemente de células mononucleares. É interessante observar que essas alterações também foram demonstradas em análise histopatológica de fígado de hamsters infectados experimentalmente com o VFA (XIAO et al., 2001).

A resposta inflamatória mononuclear é uma das principais características de encefalite viral (GRIFFIN, 1995). Os resultados obtidos em hamsters neste estudo para ambos os vírus apresentaram lesões intensas no SNC, seja no parênquima cerebral, com lesões neuronais ou na meninge, resultando em meningite com intenso infiltrado inflamatório, evidenciando novamente o neurotropismo e a capacidade desses flavivírus de causar encefalite nesses animais. A neuropatologia de oito casos pelo VROC foi descrita por Rosemberg (1980) demonstrando encefalite caracterizada por infiltração intersticial mononuclear, proliferação de

microglia e acúmulo linfocítico perivascular. Em um dos casos descritos por esse autor o paciente morto, após nove meses de doença, apresentou inflamação ativa, caracterizada principalmente pela infiltração perivascular e presença de nódulos gliais, localizado principalmente no tálamo. A ausência de cicatrizes gliais e cavidades talâmicas são provavelmente um indicativo de uma fase aguda menos severa da encefalite, a qual permitiu o paciente sobreviver até uma mais estável, mas ainda ativa fase da doença. Padrão semelhante foi observado neste estudo experimental com o VROC, mas não com o VILH.

Alguns autores consideram que o que poderia facilitar a persistência do vírus no cérebro seria a infecção neuronal. Neurônios maduros são mais resistentes à indução de apoptose, e possivelmente, esta resistência seria mediada pela expressão neuronal de inibidores de apoptose como bcl-2, bcl-x e mcl-1, que poderia ser considerado um mecanismo de preservação desta não renovável população de célula. Neurônios são deficientes em constituintes celulares necessários para apresentar antígenos que serão reconhecidos pelas células T citotóxicas, ou seja, são deficientes na expressão de moléculas do MHC de classe I (GRIFFIN, 1995). Cepas do VWN com discrepantes propriedades de neurovirulência foram capazes de causar prolongada encefalite de severidade variada, por mais de cinco meses de duração em macacos (POGODINA et al., 1981; 1983). Eventualmente, os vírus foram eliminados ou realizaram replicação com defeito e foi detectado somente a presença de antígeno viral (POGODINA et al., 1981; 1983). Este fato pode sugerir uma explicação para alguns resultados nos ensaios de IHQ terem apresentado positividade por mais tempo quando comparada a técnica de qRT-PCR (amostras de fígado e cérebro infectados pelo VILH, (figuras 12 A e B), pois apesar da técnica de

qRT-PCbR ter uma sensibilidade muito grande, o teste detecta somente o genoma do vírus, enquanto a IHQ detecta qualquer proteína viral, podendo ter ocorrido de alguma forma degradação do RNA resultando em qRT-PCR negativo, mas permanecendo proteínas virais detectáveis por IHQ. Ressalta-se que alguns vírus recuperados de cérebro de animais têm sofrido atenuação da neurovirulência, indicando a seleção para variantes genéticas e/ou partículas virais defeituosas, que podem inibir a produção de vírus infeccioso (CHAMBERS & DIAMOND, 2003).

Biologicamente, embora ambos os vírus em estudo sejam neurotrópicos, o VROC tem sido frequentemente associado com epidemia de encefalite, enquanto o VILH tem sido associado mais com doença febril de secundárias anormalidades neurológicas, refletindo claramente significantes diferenças na neurovirulência entre os dois flavivírus em estudo (VASCONCELOS et al., 1992, 1998). Com os resultados deste estudo foi possível observar algumas diferenças entre os dois vírus, o VILH induz uma resposta imunológica em hamster muito maior que o VROC, enquanto o VROC demonstrou ser mais patogênico nestes animais, sugerindo uma capacidade de neurovirulência maior que o VILH.

Os critérios para definir persistência são arbitrários (Chambers & Diamond, 2003), mas com os resultados observados neste estudo pode-se sugerir que o VROC apresentou uma infecção persistente de caráter crônico na qual o vírus é continuamente replicado e excretado. Apesar de o VILH ter apresentado infecção persistente, não foi possível sugerir o tipo de infecção persistente como sugerido por Santos (2008).

Os resultados observados neste estudo juntamente com todos os outros citados nesta dissertação sugerem que infecções persistentes podem ocorrer com uma variedade de flavivírus em vertebrados e que a persistência de flavivírus não é um fenômeno tão incomum. É necessário entretanto, estudos adicionais para determinar como exatamente a infecção persistente pelos flavivírus VROC e VILH se estabelece, incluindo a via de introdução no SNC, as células que possibilitam a infecção no SNC, os grupos celulares envolvidos na expressão da infecção e na resposta imune protetora, dentre muitos outros aspectos da patogenia.

7 CONCLUSÕES

- Hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*) demonstraram ser um bom modelo experimental para infecção persistente pelos *Flavivirus* Ilhéus e Rocio.

- Os vírus em estudo apresentaram altos níveis de anticorpos inibidores de hemaglutinação, iniciando no 5º dia p.i. e permanecendo em níveis consideráveis até o final do experimento (quatro meses).

- O VROC demonstrou maior patogenicidade quando comparado com o VILH, enquanto o VILH mostrou ser mais imunogênico que o VROC.

- As amostras coletadas dos hamsters infectados com os VROC e VILH durante a cinética experimental e inoculados em células VERO não apresentaram persistência viral em células VERO, mas confirmaram a replicação viral em todos os órgãos, sangue, soro e urina para ambos os vírus em estudo através da IFI.

- O VROC apresentou persistência viral nas amostras de fígado, cérebro e sangue por três meses detectado por qRT-PCR, enquanto o VILH apresentou persistência viral nas amostras de cérebro por 30 dias p.i. detectado por qRT-PCR.

- Os VILH e VROC promoveram infecção pantrópica.

- O VROC foi capaz de produzir em hamsters alterações patológicas, e expressão de antígenos virais nas amostras de fígado, rim, pulmão e cérebro coletados durante a cinética por quatro meses.

- O VILH produziu alterações patológicas e expressão de antígenos virais por 30 dias p.i. nas amostras de fígado, rim, pulmão coletadas durante a cinética experimental; e nas amostras de cérebro por quatro meses.

- Lesões teciduais produzidas por ambos os vírus em estudo foram mais evidentes no SNC seguido pelo fígado.

- Não foi encontrada expressão de antígenos virais pela análise de IHQ nas amostras de baço e coração de hamsters infectados por ambos os vírus em estudo, sugerindo que as alterações histopatológicas observadas são provavelmente decorrentes da passagem dos vírus na corrente sanguínea ou devido alterações metabólicas.

- Pode-se sugerir que o VROC apresentou uma infecção persistente de caráter crônico, em hamsters jovens onde o vírus é continuamente replicado e excretado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIRUTNAN, P.; MALASIT, P.; SELIGER, B.; BHAKDI, S.; HUSMANN, M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **The Journal of Immunology**, **161**: 6338-6346, 1998.

AZEVEDO, S. S. R. **Estudo experimental sobre a patogenicidade do Vírus Ilhéus em Hamsters Jovens (*mesocricetus auratus*)**. Dissertação de Mestrado. Belém, Universidade federal do Pará, 2004, 73p.

BARROS, V. L. R. S. **Arbovírus Morumbi (*Phlebovirus: Bunyaviridae*) - Estudo Histopatológico e Imuno-Histoquímico do Fígado na Infecção Experimental em Camundongos: comparação entre as vias cerebral, intraperitoneal e subcutânea**. Dissertação de Mestrado. Belém, Universidade Federal do Pará, 2000, 134 p.

BATTEGAY, M., MOSKOPHIDIS, D., RAHEMTULLA, A., HENGARTNER, H., MAK, T. W., ZINKERNAGEL, R. M. Enhanced establishment of a virus carrier state in adult CD4+ T-cell-deficient mice. **Journal of Virology**, **68**, 4700– 4708, 1994.

BEATY, B. J., CALISHER, C. H., SHOPE, R. E. Arboviruses. In: Schmidt N. J. & Emmons, E. W. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. 1. ed. Washington, American Public Health Association, 1989. p. 797-855.

BIELEFELDT-OHMANN, H. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. **Virus Reviews & Research**, **57**: 63-79, 1998.

BYRNE, S. N.; HALLIDAY, G. M.; JOHNSTON, L. J.; KING, N. J. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced langerhans cell migration from the skin in C57BL/6mice. **The journal of Investigative dermatology**, **117**: 702-709, 2001.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S. Antigenic Relationship Between Flaviviruses as Determined by Cross Neutralization Tests with Polyclonal Anti-sera. **Journal of General Virology**, **70**: 3743, 1989.

CALISHER, C. H., GOULD, E. A. Taxonomy of the Virus Family Flaviviridae. In: CHAMBERS, T. J., MONATH, T. P. **The Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity**. 1. ed. v. 60. California, Elsevier Academic Press, 2003. p. 3-17.

CASALS, J. Viruses: The Versalite Parasites the Arthropode-borne Group of Animal Viruses. **Transactions of the New York Academic Science**, **19**: 219-235, 1957.

CHAMBERS, T. J.; MICHAEL, S. D.; Pathogenesis of Flavivirus Encephalitis. In: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P. **The Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity**., 1.ed. v. 60. California, Elsevier Academic Press, 2003. p. 273-316.

CLARK, D. H., CASALS, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 7: 561-73, 1958.

CRUZ, A. C. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; FERREIRA, I. I.; ALBUQUERQUE, M. M. M.; GALLER, R. Ilhéus Vírus (Flaviviridae, *Flavivirus*) Is Closely Related to Japanese Encephalitis Vírus Complex. **Intervirolgy**, 40: 220-225, 1997.

DIAMOND, M.; EDGRIL. D.; ROBERTS, T. G.; LU, B.; HARRIS, E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. **Journal of Virology**, 74: 7814-7823, 2000.

DIAMOND, M. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. **Immunology and Cell Biology**, 81: 196-206, 2003.

DIAS, L. B. Patologia natural e experimental de arbovírus e virus correlatus isolados na Amazônia. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Vol 1. Belém: Fundação de Serviços de Saúde Pública, 1986. p. 439-450.

DINIZ, J. A. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., GUZMAN, H., XU, F., XIAO, S. Y., POPOV, V. L., VASCONCELOS, P. F. C., TESH, R. B. West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: The role of astrocytes in chronic infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75 (4): 691 – 696, 2006.

ELDADAH, A. H., NATHANSON, N. Pathogenesis of West Nile virus encephalitis in mice and rats. II. Virus multiplication, evolution of immunofluorescence, and development of histological lesions in the brain. **American Journal Epidemiology**, **86**: 776-790, 1967.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILLOF, J. DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Family Faviviridae In: **Virus Taxinomy**. 8. ed. California: Elsevier Academic Press, 2005. p. 981-998.

FULTON, F. & DUMBELL, K. R. The serological comparison of strains of influenza virus. **Journal of General Microbiology**, **3**: 97-111, 1946.

GRIFFIN, D. E. Arboviruses and the central nervous system. **Springer Seminars in Immunopathology**, **17**: 121-132, 1995.

GUBLER, D. J., KUNO, G., SATHER, G. E. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **33** (1) : 158 – 165, 1984.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE D. M. **Virology**., 5. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, p.1153-1192, 2006.

HARDY, J. L.; RANDOLPH, V. B. Establishment and Characterization of St Louis Encephalitis Virus Persistent Infections in *Aedes* and *Culex* Mosquito Cell Lines. **Journal General Virology**, **69**: 2189-2198, 1988.

HASE, T.; DUBOIS, D.R.; SUMMERS, P.L.; DOWNS, M.B.; USSERY, M.A.;
Comparison of replication rates and pathogenicities between the SA14 parent and
SA14-14-2 vaccine strains of Japanese encephalitis virus in mouse brain neurons.
Archives of Virology, **130**: 131-143, 1993.

HO, L. J., WANG, J. J., SHAIQ, M. F., KAO, C. L., CHANG, D. M., HAN, S. W., LAI,
J. H. Infection of human dendritic cell by dengue virus causes cell maturation and
cytokine production. **The Journal immunology**, **166**: 1499-1506, 2001.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)
in immunoperoxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody
(pap) procedure. **Journal of histochemistry and Cytochemistry**, **29**: 557-580,
1981.

IGARASHI, A. Characteristics of *Aedes Albopictus* cells persistently infected with
dengue viruses. **Nature** **280**:690-691, 1979.

IVERSSON, L. B. Rocio Encephalitis. In: MONATH, T. P. The arboviruses:
Epidemiology and Ecology. 1 ed. Vol IV. Florida, CRC Press, p. 77-93, 1988.

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 Advanced of Science**, **44 (2/3)**: 164-166, 1992.

IWASAKI, Y.; ZHAO, J.-X.; YAMAMOTO, Y.; KONNO, H. Immunohistochemical demonstration of viral antigens in Japanese encephalitis. **Acta Neurophatology**, **70**: 79-81, 1986.

JAN, J. T.; CHATTERJEE, S.; GRIFFIN, D. E. Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide. **Journal of Virology**, **74**: 6425-6432, 2000.

JOHNSTON, L. J.; HALLIDAY, G. M.; KING, N. J. Phenotypic changes in Langerhans cells after infection with arboviruses: A role in the immune response to epidermally acquired viral infection. **Journal of Virology**, **70**: 4761-4766, 1996.

JOHNSTON, L. J.; HALLIDAY, G. M.; KING, N. J. Langerhans cell migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arboviruses. **The journal of Investigative dermatology**, **114**: 560-568, 2000.

KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates**, 3rd. Ed. San Antonio, USA: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985. 1141p.

KIMURA-KURODA, J.; ICHKAWA, M.; OGATA, A.; NAGASHIMA, K.; YASUI, K. Specific Tropism of Japanese encephalitis virus for developing neurons in primary rat brain culture. **Archives of Virology**, **130**: 477-484, 1992.

KUNO, G. Universal diagnostic RT_PCR protocol for arboviruses. **Journal of**

Virological Methods, 72: 27-41, 1998a.

KUNO, G. A manual of cell culture techniques for small arbovirus diagnostic laboratories. **Center for Disease Control**, NCID/DVBID/ADB 970-221-6400, 1998b.

KURANE, I.; JANUS, J.; ENNIS, F. A. Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. **Archives of Virology, 124:** 21-30, 1992.

LENETTE, D. A. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Lennette, E. H., Lennette, D. A., Lennette, E. T. 7. ed. Washington, American Public Health Association, 1995. p. 3 – 25.

LEVINE, B.; GRIFFIN, D. E. Molecular analysis of neurovirulent strains of Sindbis virus that evolve during persistent infection of scid mice. **Journal of Virology, 67:** 6872-6875, 1993.

LIAO, C. L.; LIN, Y. L.; WANG, J. J.; HUANG, Y. L.; YEH, C. T.; MA, S. H.; CHEN, L. K. Effect of enforced expression of human bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells. **Journal of Virology, 71:** 5963-5971, 1997.

LIBRATY, D. H; PICHYANGKUL, S.; AJARIYAKHAJORN, C.; ENDY, T. P.; ENNIS, F. A. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: Enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **Journal of Virology,**

75: 3501-3508, 2001.

LINDERBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular Biology of Flaviviruses. In: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P. **The Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity.**, 1. ed. v. 60. California, Elsevier Academic Press, 2003. p. 23-47.

LOPES, O. DE S., COIMBRA, T. L. M., SACCHETA, L. DE A., CALISHER, C. H., Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **American Journal Epidemiology**, **107**: 444, 1978.

MALKOVA, D.; FRANKOVA, V. The lymphatic system in the development of experimental tick-bone encephalitis in mice. **Acta Virologica**, **3**: 210-214, 1959

MAYO, M. A. recent revisions of the rules of virus classification and nomenclature. **Archives of Virology**, 141:2479-2484, 1996.

MATLOUBIAN, M., CONCEPCION, R. J., AHMED, R., CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. **Journal of Virology**, **68**: 8056– 8063, 1994.

MCMINN, P. C.; DALGARN, L.; WEIR, R. C. A comparison of the spread of Murray Valley encephalitis viruses of high or low neuroinvasiveness in the tissues of Swiss mice after peripheral inoculation. **Virology**, **220**: 414-423, 1996.

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 São Paulo state. **Journal of General Virology**, **88**: 2237-2246, 2007.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 3. ed. São Paulo, EPU, 1998. p.295.

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**, **20**: 171-177, 1986.

MONATH, T. P. Pathobiology of the flaviviruses. In: SCHLESINGER, S. and SCHLESINGER, M. J. **The Togaviridae and the Flaviviridae**. 1. ed. New York, Plenum Press, p. 375-440, 1986.

MONATH, T. P. Flaviviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE D. M. et al. **Virology**. 2. ed. New York, Raven Press, p. 763-806, 1990.

MONATH, T. P. Yellow fever: update. **Lancet Infectious Diseases**, **1**: 11-20, 2001.

OLDSTONE, M. B. A. Viral persistence: Parameters, mechanisms and future predictions. **Virology**, **341**: 111-118, 2005.

OLDSTONE M. B. A., Biology and pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis virus infection. **Current topics in microbiology and immunology**, **263**: 83– 117, 2002.

PENN, R. G.; GUARNER, J.; SEJVAR, J. J.; HARTMAN, H.; MCCOMB, R. D.; NEVINS, J. B.; ZAKI, S. R. Persistent Neuroinvasive West Nile Virus Infection in an Immunocompromised Patient. **Clinical Infectious Diseases**, **42**: 680-683, 2006.

PEREIRA, E. I.; SUZUKI, A.; COIMBRA, M. L. T.; SOUZA, P. R.; CHAMELET, B. L. Arbovírus Ilhéus em aves silvestres (*Sporiphila caerulescens* and *Molothrus bonariensis*). **Revista de saúde Pública**, **35** (2): 119-123, 2001.

PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., LEITE O. F. Isolation of St. Louis encephalitis vírus from a patient Belém, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30** (1) : 145 – 148, 1981.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi R, Focaccia R (Ed) São Paulo, Athtneu, 1997, p. 169-180.

POEDINGER, M.; COELEN, R. J.; MACKENZIE, J. S. Persistent Infection of Vero cells by the flavivirus Murray Valley encephalitis virus. **Journal of General Virology**, **72**: 573-578, 1991.

POGODINA, V. V., FROLOVA, M. P., MALENKO, G. V., LEVINA, L. S.,

MAMONENKO, L. L., KORESHKOVA, G. V., RALPH, N. M. Persistence of tick-borne encephalitis virus in monkeys. 1. Features of experimental infection. **Acta virologica**, **25**: 337-343, 1981.

POGODINA, V. V., FROLOVA, M. P., MALENKO, G. V., FOKINA, G. I., KORESHKOVA, G. V., KISELEVA, L. L., BOCHKOVA, N. G., RALPH, N. M. Study on West Nile virus persistence in monkeys. **Archives of Virology**, **75**: 71-86, 1983.

PROPHET, E. B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B., SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington, American Registry of Pathology, 1992. p. 3-80.

QUARESMA, J. A., BARROS, V. L. FERNANDES, E. R., PAGLIALI, C., TAKURA, C. F., VASCONCELOS, P. F., ANDRADE, H. F., DUARTE, M. I. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. **Acta Tropica**, **94(2)**: 116-27, 2005.

QUARESMA, J. A., BARROS, V. L., PAGLIALI, C., FERNANDES, E. R., GUEDES, F., TAKURA, C. F., ANDRADE, H. F., VASCONCELOS, P. F., DUARTE, M. I. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. **Virology**, **345(1)**: 22-30, 2006.

RANDOLPH, V. A.; HARDY, J. L. Phenotypes of St. Louis encephalitis virus mutants produced in persistently infected mosquito cell cultures. **Journal of General**

Virology, **69**:2199-2207, 1988.

REED, L. S., MUENCH, H. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, **27**: 493 – 497, 1938.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L. S.; BISIBORDI, I.; PETRALLA, S. M. C. N.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. L. M.; BESSA, T. A. F.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. B. Q.; KATZ, G. SUZUKI, A. St. Louis Encephalitis Vírus: First isolation From A Human In São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **47** (5): 281-285, 2005.

ROSEMBERG, S. Neuropathology of S. Paulo south coast epidemic encephalitis (*Rocio Flavivirus*). **Journal of the Neurological Sciences**, **45**: 1-12, 1980.

SANTOS, N. S. de O., ROMANOS, V. T. M., WIGG, D. M. Introdução à VIROLOGIA HUMANA. In: SANTOS, N. S. de O. **Patogênese das Infecções Virais**. 2. Ed.-Rio de Janeiro: Guanabar Koogan, 2008, cap. 2, p. 42-58.

SCHMALJONH, C.; BLAIR, C. D. Persistent Infection of Cultured Mammalian Cells by Japanese Encephalitis Virus. **Journal of Virology**, 580-589, 1977.

SHAH, P. S.; GADKARI, D. A. Persistent infection of porcine kidney cells with Japanese encephalitis virus. Ind. **The journal of medical research**, **85**:481-491, 1987.

SHOPE, R. E. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals.

Anais de Microbiologia, **11**: 167-171, 1963.

SIIRIN, M.; DUAN, T.; LEI, H. GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; WATTS, M. D.; XIAO, S. Y.; TESH, R. B. Chronic St. Louis Encephalitis Virus Infection in The Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76** (2): 299-306, 2007.

SOLOMON, T. M. D. Flavivirus Encephalitis. **The New England journal of Medicine**, **351**: 370-378, 2004.

STRAATMANN, A.; TORRES, S. 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**, **30** (6): 512-515, 1997.

SU, H. L.; LIAO, C. L.; LIN, Y. L. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. **Journal of Virology**, **76**: 4162-4171, 2002.

TESH, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **28**(6):1053-9, 1979.

TESH, R. B.; GUZMAN, H.; DA ROSA, A. P., et al. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. **The Journal of Infectious Diseases**, **183**:1431-1436, 2001.

TESH, R. B.; SIIRIN, M.; GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., XIAOYAN, 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. **The Journal of Infectious Diseases**, 192 (15): 287-295, 2005.

THEILER, M. R. C. S and SMITH, M. D. The Effect of Prolonged Cultivation in Vitro Upon The Pathogenicity Of Yellow Fever Virus. **The Journal of Experimental Medicine**, Vol 65, 767-786, Copyright, 1937, by The Rockefeller Institute for Medical Research New York.

TIRIBA, A. DA C. Epidemiologia de Encefalite Atribuída a Arbovírus, Ocorrida no Litoral Sul do Estado de São Paulo em 1975: Contribuição para o Estudo Clínico, Ph.D. thesis, **Escola Paulista de Medicina**, São Paulo, 1975.

TIRIBA, A. DA C. MIZIARA, A. M., LOURENÇO, R., COSTA, C. R. B. COSTA, C. DA S., PINTO, G. H. Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do estado de São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **22**: 415, 1976.

TISHON, A., LEWICKI, H., RALL, G., VON HERRATH, M., OLDSTONE, M. B. A. An essential role for type 1 interferon-g in terminating persistent viral infection. **Virology**, **212**, 244–250, 1995.

TONRY, J. H.; XIAO, S. Y; SIIRIN, M.; CHEN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TESH, R. B. Persistent Shedding of West Nile Virus in Urine of Experimentally Infected Hamsters. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **72** (3) : 320 – 324, 2005.

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. Documento Técnico nº 2. **Os Arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo**. Instituto Evandro Chagas/FNS/Belém, 1994, 46 p.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses In: LEÃO, R.N.Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1. ed. Belém Cejup – UEPA - Instituto Evandro Chagas, 1997, p. 207 – 226.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., PINHEIRO, F. P., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., DIAS, L. B., CRUZ, A. C. R., Arboviruses isolated in Evandro Chagas Institute, including some described from the first time in Brazilian Amazon region: their known hosts, and their pathology for man. In: Travassos da Rosa, A.P.A.,

Vasconcelos, P.F.C., Travassos da Rosa, J.F.S. **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. 1. ed. 1998, p. 19 – 31.

VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DEGALLIER, N., PINHEIRO, F. P.; SÁ FILHO, G. C. Epidemiologia das Encefalites por Arbovírus na Amazônia Brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **33** (6): 465-475, 1991.

VASCONCELOS, PEDRO F. C; ROSA, AMÉLIA P. A. TRAVASSOS DA; DEGALLIER, NICOLAS; ROSA, JORGE F. S. TRAVASSOS DA; PINHEIRO, FRANCISCO P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazônia. **Ciência e cultura / Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 44(2/3):117-24, Mar.-Jun. 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., DEGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Travassos da Rosa, A. P. A, Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S (eds.). Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72-94

VLAYCHEVA, L.; CHAMBERS, T. J. Neuroblastoma cell-adapted yellow fever 17D: Characterization of a viral variant associated with persistent infection and decreased virus spread. **Journal of Virology**, **75**:10912-10922, 2002.

WANG, J. J.; LIAO, C. L.; CHIOU, Y. W.; CHIOU, C. T., HUANG, Y. L.; CHEN, L. K. Ultrastructure and localization of E proteins in cultured neuron cells infected with Japanese encephalitis virus. **Virology**, **238**: 30-39, 1997.

WEINER, L. P.; COLE, G. A.; NATHANSON, N. Experimental encephalitis following peripheral inoculation of West Nile virus in mice of different ages. **Journal of Hygiene**, **68**: 435-446, 1970.

WHO Scientific Group. Arthropod-Borne and rodent-borne viral disease, **Technical Report series**, N^o 719. Geneva, World Health Organization, 1985.

WU, S. J.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; MASCOLA, J. R.; BRACHTEL, E.; PUTVATANA, R.; LOURDE, M. K.; FILGUEIRA, L; MAROVICH, M. A.; WONGH.K.; BLAUVELT, A.; MAUPHY, G. S.; ROBB, M. L.; INNES, B. L.; BIRXD. L.; HAYES, C. G.; FRANKEL,S. S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature medicine**, **6**: 816-820, 2000.

XIAO, S. Y., ZHANG, H., GUZMAN, H., TESH, R. B. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **The Journal Infectious Diseases**, **183**: 1437-1444, 2001.

XIAO, S. Y., GUZMAN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., ZHU, H. B., TESH, R. B. Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model of previous infection with heterologous flaviviruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **68**: 695-703, 2003.

YONG, Y. K., THAYAN, R., CHONG, H. T., TAN, C. T., SEKARAN, S. D. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. **Singapore medical journal**, 48: 662, 2007.

Anexo 1

Cópia do memorando que autoriza a utilização das amostras dos vírus Ilhéus (BE H 7445) e Rocio (SP H 34675) pertencentes ao acervo da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas.

Anexo 2

Cópia do parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisas com animais (CEPAN)/IEC/SVS/MS.