

VERA LÚCIA REIS SOUZA DE BARROS

ARBOVÍRUS MORUMBI (PHLEBOVIRUS: BUNYAVIRIDAE) —
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO
FIGADO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS:
comparação entre as vias cerebral, intraperitoneal e subcutânea.

Belém-Pará
2000

VERA LÚCIA REIS SOUZA DE BARROS

ARBOVÍRUS MORUMBI (*PHLEBOVIRUS: BUNYAVIRIDAE*) –
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO
FÍGADO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS:
comparação entre as vias cerebral, intraperitoneal e subcutânea.

Belém - Pará
2000

VERA LÚCIA REIS SOUZA DE BARROS

**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 apresentada ao Curso de Pós
graduação do Núcleo de Medicina Tropical da
Universidade Federal do Pará com a
colaboração do Instituto Evandro Chagas,
para a obtenção do Grau de Mestre em
Medicina Tropical.

Orientador: Dr. Venâncio A. Ferreira Alves.

Co-orientadora: Dra. Amélia P. A. Travassos
da Rosa.

Belém - Pará
2000

616.07561
B277a
DIS
ex.2

VERA LÚCIA REIS SOUZA DE BARROS

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 aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Medicina
Tropical no Curso de Pós – Graduação do
Núcleo de Medicina Tropical da Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Dr. Venâncio A. Ferreira Alves

Co-orientadora: Dra. Amélia P. A. Travassos
da Rosa

Banca Examinadora:

Dr. Sérgio Zucoloto
Dr. Pedro F. C. Vasconcelos
Dr^a. Tereza C. O. Corvelo

Belém–Pará
2000

B277a Barros, Vera Lúcia Reis Souza

Arbovírus Morumbi (*Phlebovirus: Bunyaviridae*): estudo histopatológico e imuno-histoquímico do fígado na infecção experimental em camundongos: comparação entre as vias cerebral, intraperitoneal e subcutânea / Vera Lúcia Reis Souza Barros. — Belém, 2000.

113f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) — Universidade Federal do Pará, 2000.

1. Arbovírus — Patologia. 2. Arbovírus. — Imunologia 3. Infecções por arbovírus. 4. Fígado - Fisiopatologia. 5. Modelos animais. I. Título.

CDU: 616.988

"O degrau da escada não foi inventado para repouso, mas para sustentar o pé o tempo necessário para que o homem coloque o outro pé um pouco mais alto".

(Ruxley)

In memoriam aos meus queridos pais
Frederico Antenor Monte e Lucinda dos
Reis Monte e ao professor e amigo
Ronaldo de Araújo, cujo o incentivo em
muito contribuiu para minha formação
profissional

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Venâncio Alves com seu entusiasmo, ensinamentos e incentivos, proporcionando o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Dra. Amélia A. P. Travassos da Rosa pelo seu carinho, amizade e valioso ensinamento e orientação durante o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus professores Dra. Marialva Araújo e Dr. Leônidas Braga Dias, exemplo de pesquisadores incansáveis, que serviram de incentivo para a busca de novos conhecimentos.

Ao Dr. Mário Moraes e Dra. Gilberta Bensabath, que concederam-me a oportunidade de trabalhar nesta Instituição e assim estimular com seus ensinamentos a buscar a pós-graduação.

Ao Dr. Jorge Fernando Soares Travassos da Rosa, Diretor do Instituto Evandro Chagas, pelo seu desempenho administrativo e incentivo, proporcionando todas as condições para a realização do Curso de Mestrado e desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Conceição Pinheiro, Coordenadora do Núcleo de Medicina Tropical, não só pelo incentivo, como pela luta para a manutenção e ampliação do Curso de Pós-Graduação.

Ao Dr. Cláudio Amorim, Coordenador do Curso de Mestrado, pela luta para concluirmos o Mestrado.

A todos os professores do Mestrado em Medicina Tropical, pelos ensinamentos no período do curso.

Aos Doutores Samia Demachke e Manoel Soares, pelo apoio e leitura crítica dos originais.

Ao Dr. Edvaldo Silveira, pelo apoio na realização dos exames histopatológicos, possibilitando-me um pouco de tempo para o preparo desta dissertação.

Ao Sr. Basílio Buna, pelo auxílio durante a inoculação dos animais de laboratório, para realização deste estudo.

Ao Dr. José Antônio Diniz, pelo apoio na obtenção do material fotográfico para compor este trabalho.

À Dra. Alda Wakamatsu, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na realização da técnica de imuno-histoquímica.

À bibliotecária Graça Sampaio, pelo prestimoso auxílio com as referências bibliográficas.

À Vânia Barbosa, bibliotecária do I.E.C., e ao Sr. Nonato pela atenção e atendimento as pesquisas bibliográficas.

A todos os funcionários do Serviço de Patologia do I.E.C., pelo carinho e compreensão e em especial ao Sr. Valter Miranda Campos pelo preparo das lâminas para diagnóstico histopatológico e as Sras. Lourdes Gomes e Luciene Aranha, assim como a Sra. Júlia Aarão que contribuíram com serviços de digitação para o preparo deste trabalho.

À Rosane do Socorro Pompeu, pelo auxílio na área de informática.

A todas as amigas do curso de Mestrado de Medicina Tropical, Consuelo Silva Oliveira, Rosana Maria Feio Libonati, Rita Uchôa, Esther Castelo Branco Mello Miranda e Helena Andrade Zefirino Brígido, pelo carinho e apoio transmitidos ao longo da realização do curso.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE VÍRUS.....	3
2.2. ARBOVÍRUS.....	4
2.2.1. Família <i>Bunyaviridae</i>	5
2.2.1.1. Gênero <i>Phlebovirus</i>	6
2.2.1.2. Grupo <i>Phlebotomus</i>	9
2.2.1.3. <i>Phlebovirus</i> na Amazônia Brasileira.....	10
2.2.1.4. Vírus Morumbi.....	11
2.3. FEBRE DO PHLEBOTOMUS.....	14
2.3.1. Histórico.....	14
2.3.2. Aspectos epidemiológicos.....	15
2.3.3. Aspectos clínicos e laboratoriais.....	20
2.3.4. Terapêutica, prevenção e controle.....	24
2.3.5. Aspectos anátomo-patológicos.....	26
2.3.6. Modelos experimentais.....	26
2.3.6.1. Voluntários humanos.....	26
2.3.6.2. Primatas não humanos.....	28
2.3.6.3. Camundongos.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. OBJETIVO GERAL.....	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	34
5.2. OBTENÇÃO DO LÍQUIDO ASCÍTICO IMUNE.....	34
5.3. DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO.....	35

5.4.	COLETA DO MATERIAL E PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS.....	36
5.5.	PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	38
5.6.	PREPARO DO MATERIAL PARA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	38
5.6.1.	Processamento imuno-histoquímico.....	39
5.6.2.	Controles utilizados na pesquisa de antígenos.....	40
5.6.2.1.	Controle positivo.....	40
5.6.2.2.	Controles negativos.....	40
5.7.	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	41
5.8.	ANÁLISE DO TESTE IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	43
6.	RESULTADOS.....	44
6.1.	ANÁLISE CLÍNICA.....	44
6.2.	ANÁLISE MACROSCÓPICA DO FÍGADO.....	44
6.3.	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO.....	45
6.3.1.	Alterações Portais.....	45
6.3.2.	Alterações Lobulares.....	50
6.3.2.1.	Alterações hepatocitárias.....	50
6.3.2.2.	Outras alterações lobulares.....	58
6.3.3.	Avaliação Geral sobre a Intensidade da Hepatite.....	65
6.3.4.	Distribuição do Antígeno.....	67
6.3.5.	Interrelações entre as Variáveis.....	73
7.	DISCUSSÃO.....	76
7.1.	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO.....	77
7.2.	CONHECIMENTOS ATUAIS DE MECANISMOS PATOGENÉTICOS.....	86
8.	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
	ANEXOS	105

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Pág
Tabela 1	Freqüência da intensidade do edema em área portal conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 46
Tabela 2	Freqüência da intensidade do infiltrado inflamatório em área portal conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 47
Tabela 3	Freqüência da intensidade da dilatação de ramos venosos portais conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 48
Tabela 4	Freqüência da intensidade da tumefação nos hepatócitos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício... 51
Tabela 5	Freqüência da intensidade da metamorfose gordurosa nos hepatócitos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 52
Tabela 6	Freqüência da intensidade do aparecimento de corpúsculo acidófilo nos hepatócitos, conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 55
Tabela 7	Freqüência da intensidade da regeneração hepática, conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 56
Tabela 8	Freqüência da intensidade do infiltrado inflamatório nos lóbulos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.... 59
Tabela 9	Freqüência da dilatação de vênula hepática terminal (centrolublar) conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 61
Tabela 10	Freqüência da intensidade de dilatação dos sinusóides conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício... 62
Tabela 11	Freqüência da intensidade da colestase conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 63
Tabela 12	Freqüência da intensidade da hepatite experimental de acordo com os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 66
Tabela 13	Distribuição do antígeno do vírus Morumbi no fígado de camundongos <i>Swiss</i> com hepatite de acordo com os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício..... 70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura		Pág
Figura 1.	Situação taxonômica dos vírus do Grupo <i>Phlebotomus</i> , destacando o vírus Morumbi.....	12
Figura 2.	Esquema da partícula íntegra dos <i>Phlebovirus</i> . Observar a presença de espículas superficiais por glicoproteínas (G1 e G2) emergentes do envelope lipídico e a presença de três segmentos genômicos helicoidais e complementares.....	14
Figura 3.	Distribuição dos grupos e subgrupos durante o experimento.....	37
Figura 4.	Distribuição cronológica das modas das alterações portais de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.....	49
Figura 5.	Corte de fígado de animal do grupo controle exibindo arquitetura habitual, estruturas preservadas, com número razoável de células hematopoiéticas (HE -x200).....	53
Figura 6.	Seções de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando degeneração gordurosa, macro e microvesicular. A) Detalhe da alteração do subgrupo IC (HE - x1000); B) Subgrupo IP (HE - x400) C) Subgrupo SC (HE - x400).....	53
Figura 7.	Corte de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando necrose e presença de corpúsculos acidófilos (Councilman - Rocha Lima). A) Subgrupo IC (HE - x200); B) Subgrupo IP (HE - x400); C) Subgrupo SC (HE - x400).....	55
Figura 8.	Distribuição cronológica das modas das alterações hepatocitárias de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.....	57
Figura 9.	Seção de fígado de animal do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando parênquima com sinais de regeneração celular (HE - x400).....	58
Figura 10.	Corte de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando reação inflamatória no parênquima. A) Subgrupo IC (HE -x400); B) Subgrupo IP (HE - x200).....	60

Figura 11.	Distribuição cronológica das modas de outras alterações lobulares de acordo com as vias e horas de sacrifício.....	64
Figura 12.	Distribuição cronológica das modas de freqüência da intensidade da hepatite pelo vírus Morumbi de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.....	66
Figura 13.	Cortes de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi, submetidos ao teste imuno-histoquímico. A) Controle negativo (IHQ – x400). B) Reação positiva no hepatócito de padrão granular (IHQ – x1000).....	67
Figura 14.	Distribuição cronológica das modas da intensidade do antígeno do vírus Morumbi de acordo com as vias e horas de sacrifício.....	70
Figura 15.	Cortes de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi, subgrupo IC, mostrando imunorreação nos hepatócitos e células de Kupffer. A) 24h (IHQ - x200); B) 48h (IHQ – x400); C) 72h. (IHQ - x400).....	71
Figura 16.	Cortes de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi, exibindo imunorreação no citoplasma celular. A) Subgrupo IP 72h, com reação intensa. (IHQ - x200); B) Subgrupo SC 48h, com reação moderada (IHQ – x200).....	71
Figura 17.	Distribuição geral do antígeno na infecção pelo vírus Morumbi conforme as vias de inoculação e horas de sacrifício.....	72
Figura 18.	Distribuição cronológica das modas da incidência do antígeno do vírus Morumbi nos lóbulos de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.....	73
Figura 19.	Comparação entre atividade histopatológica geral e a reação imuno-histoquímica para antígeno viral conforme as vias de inoculação e horas de sacrifício.....	76

RESUMO

O vírus Morumbi é membro do sorogrupo *Phlebotomus fever* (família *Bunyaviridae*; gênero *Phlebovirus*) nativo da Região Amazônica. Seu vetor é desconhecido mas supõem-se ser transmitido por flebotomíneos. Foi isolado em 1988 de ser humano apresentando quadro febril agudo. Este arbovírus, quando inoculado em camundongo por via cerebral, demonstrou viscerotropismo, induzindo inclusive lesões no fígado do animal inoculado. Com os objetivos de: i) estabelecer as características anátomo-patológicas e imuno-histoquímicas em fígado de camundongos albinos *Swiss* recém-nascidos experimentalmente infectados pelo vírus Morumbi; ii) verificar se o vírus apresenta hepatotropismo diferenciado na dependência de inoculação pelas vias cerebral, peritoneal ou subcutânea; iii) caracterizar detalhadamente os padrões anátomo-patológicos sequenciais no fígado; iv) demonstrar a localização do antígeno viral no tecido hepático ao longo da infecção experimental; v) estudar possíveis inter-relações entre os achados anátomo-patológicos e os imuno-histoquímicos. Foram estudados experimentalmente 71 camundongos *Swiss* recém-nascidos (dois e três dias), distribuídos ao final do experimento como segue: 21 animais inoculados por via intracerebral (IC), 21 por via intraperitoneal (IP) e 29 animais inoculados por via subcutânea (SC). Utilizou-se a dose infectante 5,0 DL₅₀/0,02ml de suspensão de vírus. Outros trinta, animais que não receberam inóculos, foram utilizados como grupo controle. Subgrupos de oito animais (seis inoculados e dois do grupo controle) foram sacrificados diariamente a intervalos de 24 em 24 horas, até 96 horas para os grupos IC e IP e até 120 horas para o grupo SC. Fragmentos de fígado de todos os animais foram fixados em solução de formalina neutra a 10%, incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes de 5µm que foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina para análise morfológica e, cortes adicionais, foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica (Sistema Envision, DAKO, USA), utilizando a fosfatase alcalina e soro hiperimune do vírus Morumbi preparado em camundongos jovens, para detecção de antígeno viral. Foram estudados seis parâmetros de lesão em áreas portais e nove outros nos lóbulos, que foram semiquantificados numa escala que variou de zero (0) a três cruces (+++), onde zero significou ausência de lesão e três cruces lesão intensa. À microscopia óptica, ficou evidente que o vírus Morumbi inoculado em camundongos por três diferentes vias induz lesões em áreas portais e lobulares, caracterizando uma hepatite aguda com presença de corpúsculos acidófilos, semelhantes aos corpúsculos de Councilman - Rocha Lima, de distribuição irregular nos lóbulos, cujo aparecimento foi observado 24 horas pós-inoculação (p.i.) e atingiu o máximo de intensidade às 72 horas p.i. em animais inoculados por via IP. O exame imuno-histoquímico mostrou presença leve de antígeno viral a partir de 24 horas p.i. no grupo IC e a partir de 48 horas p.i. nos grupos IP e SC, havendo certo paralelismo em relação a intensidade de lesão morfológica, tendo-se observado o máximo de detecção de antígeno viral em animais inoculados por via IP e sacrificados às 72 horas p.i. A distribuição geral de antígeno foi observada especificamente nos lóbulos hepáticos, no citoplasma de hepatócitos íntegros e necrosados e no interior de células de Kupffer, não havendo preferência por nenhuma das três zonas do lóbulo. Concluiu-se que: i) o modelo

de infecção experimental em camundongos foi excelente para o estudo das lesões causadas pelo vírus Morumbi, podendo ser selecionada a via IP como referencial; ii) em todas as vias utilizadas (IP, IC e SC) se confirmou a infecção pelo vírus Morumbi com marcante detecção de seu antígeno, no tecido hepático de camundongos *Swiss*; iii) a presença de antígeno do vírus Morumbi no fígado desses camundongos associou-se ao aparecimento de hepatite aguda, com necrose focal; iv) hepatite aguda intensa pôde ser observada em fígado de camundongos sacrificados 72h p.i. com o vírus Morumbi por via IP, o que não foi verificado com as outras duas vias; v) a hepatite aguda mostrou-se limitada, neste experimento, tendendo a desaparecer na maioria dos camundongos inoculados, com avançar das horas; vi) colestase não foi alteração freqüente na hepatite experimental pelo vírus Morumbi, quando inoculado por via IC, IP ou SC; vii) o antígeno do vírus Morumbi teve predominância pela localização intracitoplasmática, padrão granular, nos hepatócitos e células de Kupffer; viii) antígeno viral foi detectado em fragmento hepático de animais experimentalmente inoculados com o vírus Morumbi, a partir de 24 horas via IC e a partir de 48 horas nas vias IP e SC.

1. INTRODUÇÃO

Os *Phlebovirus* são arbovírus que se encontram universalmente distribuídos, sendo reponsáveis pelo aparecimento da doença conhecida como febre do *Phlebotomus*. No Velho Mundo, há muito se tem conhecimento da existência desses vírus que chamaram atenção, durante uma epidemia ocorrida na II Guerra Mundial (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996). Atualmente, a ocorrência de epidemias ou de casos esporádicos é observada em áreas endêmicas da Europa, Ásia e África, onde além dos nativos, turistas e militares deslocados para essas regiões tornam-se alvos dessa arbovirose. A doença manifesta-se sob forma febril, geralmente de evolução autolimitada, podendo em alguns casos complicar e tornar-se grave, evoluindo para cura ou para o óbito (Laughlin *et al.*, 1979; Ehrnst *et al.*, 1985).

No Novo Mundo, durante os anos 60, arbovírus desse gênero foram identificados, inicialmente nas Américas do Sul e Central e posteriormente na América do Norte (McLean, 1972; Srihongse & Johnson, 1974; Calisher *et al.*, 1977). A doença humana é de ocorrência esporádica e todas as apresentações até hoje registradas na literatura, nas Américas do Sul e Central, foram da forma aguda febril autolimitada (Karabatsos, 1985; Pinheiro, 1986; Vasconcelos *et al.*, 1992).

Estudos realizados na Amazônia Brasileira de 1954 a 1998, por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas (IEC), revelaram a existência de 186 tipos diferentes de arbovírus e de certos vírus isolados de vertebrados, 84 dos quais são novos para o mundo (Travassos da Rosa, *et al.*, 1998). Destes 186 tipos, 155 pertencem a 21 grupos antigênicos distintos e os 31 restantes ainda não foram grupados e/ou classificados.

Trinta e quatro desses agentes são comprovadamente patogênicos para o homem, produzindo doença febril isolada, ou associada com exantema, doença hemorrágica e encefalite. A infecção humana por 31 deles já foi demonstrada através do isolamento do agente, a partir do sangue de doentes, enquanto para os três restantes, a infecção foi evidenciada exclusivamente em bases sorológicas na região. De um modo geral, os casos clínicos comprovados mediante isolamento viral foram observados em pessoas que mantinham contacto com a mata, excetuando-se as que foram infectadas em laboratório e os casos de dengue e oropouche (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

O vírus Morumbi (BE H 475236) foi isolado do sangue de um paciente febril que evoluiu com quadro clínico semelhante ao da febre do dengue em 12/04/1988, em Novo Repartimento, Tucuruí, Pará. Quando, em estudo anterior no IEC, foi inoculado experimentalmente, causou um quadro de hepatite em camundongos albinos *Swiss* recém-nascidos. Tais evidências iniciais motivaram o planejamento do presente estudo, visando à análise de seqüência das lesões histopatológicas hepáticas e suas relações com a via de inoculação e com a distribuição de antígeno viral mediante imuno-histoquímica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE VÍRUS

Os vírus são microrganismos de dimensões reduzidas, constituídos por um único tipo de ácido nucleico, ácido desoxiribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA). Sua multiplicação é feita sob uma forma particular em que seus componentes são sintetizados independentemente. São metabolicamente inertes e por isso dependem de parasitismo celular estrito, podendo infectar vegetais, o homem e outros animais (Mims & White, 1988; Oliveira, 1994).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, criado em 1966, determina que as famílias virais sejam designadas por termos finalizados em *viridae*, as sub-famílias, em *virinae* e os gêneros com a palavra *vírus*, sendo que as espécies ainda não foram designadas formalmente.

A 6ª edição de Classificação e Nomenclatura dos Vírus publicada (1995), levando em consideração a Taxonomia Universal, registra uma ordem, 71 famílias, das quais 24 contêm vírus que infectam humanos e animais, nove subfamílias, 164 gêneros incluindo 24 gêneros flutuantes e mais de 3.600 espécies de vírus (Murphy *et al.*, 1995). Dentre esses, está um grupo particular de vírus, de características próprias, denominado arbovírus e que chama atenção por conter agentes patogênicos para o homem, alguns deles contribuindo para o aparecimento de situações endêmicas e até epidêmicas, constituindo-se muitas vezes em problema de saúde pública no mundo, por sua extensa distribuição nos diferentes Continentes (Pinheiro *et al.*, 1996).

2.2. ARBOVÍRUS

O termo arbovírus é oriundo da expressão inglesa *arthropod-borne*, de onde foram retiradas as duas primeiras sílabas e acrescida a palavra vírus.

De acordo com o manual da Organização Mundial de Saúde, os arbovírus são vírus que se mantêm na natureza, principalmente mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos ou de artrópodes a artrópodes, através da via transovariana e possivelmente da via venérea; multiplicam-se e produzem viremia nos vertebrados, multiplicam-se nos tecidos dos artrópodes e são passados a novos vertebrados suscetíveis através da picada de inseto, após um período de incubação extrínseca (WHO, 1985).

Os arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, com 537 membros registrados no suplemento nº 106 de maio de 1996 da terceira edição do *International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates*, sendo que 139 deles são patogênicos para o homem (Karabatsos, 1985).

Os arbovírus caracterizam-se, de um modo geral, por conter genoma constituído por RNA, com uma única exceção, o vírus da febre suína africana que possui DNA. O genoma RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não e apresenta-se com uma ou duas fitas. Arbovírus com genomas não segmentados incluem os gêneros *Alphavirus* (*Togaviridae*), *Flavivirus* (*Flaviviridae*), *Lyssavirus* e *Vesiculovirus* (*Rhabdoviridae*), enquanto aqueles com genomas segmentados incluem os *Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) e os *Orbivirus* (*Reoviridae*), (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Os arbovírus são classificados de acordo com suas propriedades antigênicas ou segundo suas características físico-químicas (Karabatsos, 1985).

A classificação antigênica dos arbovírus adota critérios reunidos por Casals (1957) baseados principalmente nos resultados dos testes, hoje genericamente rotulados de "testes convencionais", como inibição de hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e neutralização (N). Quando dois ou mais vírus assim analisados mostram cruzamento sorológico, passam a constituir um grupo antigênico e, quando alguns membros do grupo exibem relacionamento mais íntimo, formam subgrupos ou complexos (Karabatsos, 1985; Calisher, 1988). Os 537 arbovírus registrados no International Catalogue of Arboviruses, estão distribuídos em 63 grupos antigênicos, salvo 83 que permanecem na categoria dos vírus não-grupados (Pinheiro *et al.*, 1996; Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Com base em suas propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus registrados está distribuída por cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (Travassos da Rosa *et al.*, 1997), ressaltando-se, no entanto, que nem todos os membros das citadas famílias são necessariamente arbovírus.

2.2.1. Família *Bunyaviridae*

Os vírus da família *Bunyaviridae* são encontrados em todo o mundo. A maioria deles é constituída por arbovírus mantidos na natureza por transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos, tais como mosquitos, flebotomíneos, maruins e carrapatos. Os hospedeiros vertebrados desses vírus incluem roedores e outros pequenos mamíferos, primatas, aves,

ungulados, etc. Mais de 60 membros desta família têm sido reportados por causar doença em humanos ou animais, alguns causam doença em aves marinhas ou em plantas (Calisher, 1996).

Dos 537 vírus registrados, 313 têm sido colocados na família *Bunyaviridae*, distribuídos em cinco gêneros, de acordo com suas propriedades morfológicas e antigênicas; 172 no gênero *Bunyavirus*, 10 no gênero *Hantavirus*, 34 no gênero *Nairovirus*, 51 no gênero *Phlebovirus* e 4 no gênero *Tospovirus*; 19 vírus adicionais têm características da família *Bunyaviridae* e foram colocados em grupos sorológicos, mas não assinalados em nenhum gênero, afora 23 outros vírus não grupados e não classificados (Calisher, 1996) (Figura 1).

Entre membros desta família, alguns são significantes patógeno por comprometerem simultaneamente diversos órgãos, entre eles: *Bunyavirus* (La Crosse, Oropouche, Akabane); *Nairovirus* (febre hemorrágica do Congo-Crimea, doença de carneiros de Nairobi); *Phlebovirus* (febre do Rift Valley e febre dos Phlebotomus); *Hantavirus* (Hantaan, Puumala, Sin Nombre); e *Tospovirus* (Tomato spotted wilt virus ou vírus do tomate manchado), sendo que os dois últimos gêneros não são considerados arbovirus. Outros ocasionam doença febril ou encefalite em humanos (Brès, 1988) ou doença em plantas (Avila *et al.*, 1993).

2.2.1.1. Gênero *Phlebovirus*

O gênero *Phlebovirus* inclui dois grupos de vírus, o Phlebotomus (sandfly fever group) e o grupo Uukuniemi (Calisher, 1991). Em prévia classificação taxonômica, os dois grupos, baseados em relações sorológicas, foram considerados como gêneros diferentes na família *Bunyaviridae*, mas por causa das similaridades

em suas propriedades bioquímicas e na organização e expressão do genoma, os dois grupos foram combinados em um gênero: *Phlebovirus*. Entretanto, as propriedades biológicas dos dois grupos são distintas: os vírus do grupo *Phlebotomus* são transmitidos por flebotomíneos e mosquitos, enquanto os *Uukuvirus* são transmitidos por carrapatos (Bishop & Shope, 1979). Diversos vírus do grupo *Phlebotomus*, mas nenhum dos *Uukuvirus* têm sido associados com doença em humanos embora anticorpos para o vírus Uukuniemi tenham sido detectados em humanos (Tesh, 1988; Beaty & Calisher, 1991).

O gênero *Phlebovirus* é composto de pelo menos 51 vírus diferentes (39 dentro do grupo *Phlebotomus* e 12 dentro do grupo Uukuniemi (Quadro 1) mas, as informações sobre a biologia molecular desses vírus provêm da análise de somente uns poucos deles, nominalmente Punta Toro (PT), Rift Valley fever (RVF) Sandfly fever Sicilian (SFS), Toscana (TOS) e Uukuniemi (UUK) vírus (Ihara *et al.*, 1985b).

a - Componentes Estruturais do Virion

As primeiras observações sobre a morfologia dos *Phlebovirus* foram feitas por microscopia eletrônica mediante a técnica de contraste negativo. UUK virions apresentaram-se como partículas esféricas, com diâmetro variando entre 98 e 100nm. A superfície das partículas apresentou um arranjo hexagonal regular de subunidades que parecia capsômeros ocos, com projeções medindo em torno de 9nm (Saikku & Von Bonsdorff 1968, Saikku *et al.*, 1970). Capsômeros similares tinham sido observados previamente na superfície das partículas do vírus RVF (Levitt *et al.*, 1963), e subseqüentemente características morfológicas foram descritas para dois outros *Phlebovirus*, PT e Karimabad (Smith & Pifat, 1982). Ficou

também evidente desses estudos que a organização das partículas virais ocorria exclusivamente no retículo endoplasmático liso e predominantemente nas membranas do, ou adjacente ao complexo de Golgi.

A ruptura dos virions do UUK libera um componente interior em serpentina, composto de um filamento de ribonucleoproteína (Saikku *et al.*, 1970). Como se observa a Figura 2 uma proteína N (25 KDa) mostrou-se associada com o filamento de ribonucleoproteína, enquanto duas proteínas glicosiladas, G1 e G2, de tamanhos similares (65 - 75KDa), foram associadas com projeções da superfície (Pettersen *et al.*, 1971; Von Bonsdorf & Pettersen, 1975). Polipeptídeos, também de tamanhos similares, foram encontrados nos virions de diversos *Phlebovirus* (Roberson *et al.*, 1979; Rice *et al.*, 1980). Uma quarta proteína viral L, com uma massa maior que 200 KDa, foi encontrada em virions purificados dos vírus RVF (Collett *et al.*, 1985), sendo aparentemente um componente da transcriptase viral (Bishop *et al.*, 1980).

Afora as proteínas estruturais N, NSm, G1, G2 e L, todos os *Phlebovirus* expressam uma proteína não estrutural denominada NSs. (Tyler & Fields, 1996).

Similar aos outros vírus da família *Bunyaviridae*, o genoma dos *Phlebovirus* compreende três segmentos de RNA, fita simples, polaridade negativa, helicoidais e suplementares, denominados L (grande), M (médio) e S (pequeno) que codificam as proteínas L, G1, G2 e NSm, N e NSs. Cada segmento parece conter uma única seqüência primária sem sobreposição entre os mesmos (Pettersen *et al.*, 1977, Roberson *et al.*, 1979), e estão relacionados com a formação dos nucleocapsídeos, antigenicidade, virulência em vertebrados e infectividade em invertebrados (Ihara *et al.*, 1985a). As seqüências terminais 3' de cada segmento do

RNA são conservadas no mesmo grupo de vírus e muito similar entre os demais *Phlebovirus* (Parker & Hewell, 1981; Accardi *et al.*, 1993). A sequência *non sense* consiste de oito e 11 nucleotídeos nos terminais 3' e 5', respectivamente.

2.2.1.2. Grupo Phlebotomus

O grupo Phlebotomus reúne um total de 39 vírus, 23 dos quais com propriedades bem definidas, que estão distribuídos em oito complexos antigênicos a saber: Bujaru, Candiru, Chilibre, Frijoles, Punta Toro, Rift Valley fever, Salehabad e um complexo não definido contendo 16 vírus (Murphy *et al.*, 1995).

Entre os 39 vírus do grupo Phlebotomus, registrados no Catálogo Internacional, destacam-se oito deles, devido sua importância médica, quais sejam: Sicilian (SFS), Naples (SFN), Toscana (TOS), Rift Valley fever (RVF), Chagres (CHG), Punta Toro (PT), Candiru (CDU) e Alenquer (ALE), todos isolados de pessoas com quadro clínico de doença febril aguda (Karabatsos, 1985). Por outro lado, evidência sorológica de infecção humana tem sido demonstrada com outros vírus do grupo: Arumowot, Bujaru, Itaporanga, Gabek Forest, Gordil, Karimabad e Saint Floris (Tesh *et al.*, 1982).

De todos os vírus relacionados com doença humana, o RVF é o único que produz ainda, doença em animais domésticos (Tesh, 1988).

Os vírus do grupo Phlebotomus podem adaptar-se em hamsters e camundongos recém-nascidos, mediante passagem intracerebral seriada (Tesh, 1992). Segundo Tesh (1988), alguns vírus do grupo Phlebotomus produzem efeito citopático em cultura de células Vero. Sendo que SFN, SFS e Karimabad apresentam ainda, efeitos em outros dois tipos de células ou linhagens BHK – 21 e

MA – 111 (Tesh, 1992). Em culturas originadas de células de artrópodes, não replicam naquelas produzidas a partir de células de mosquitos, no entanto, replicam em culturas de flebotomíneos, estando na dependência do tipo de vírus em estudo e da espécie de flebotomíneo utilizado para cultura (Tesh, 1988).

O grupo Uukuniemi está constituído por um único sorogrupo, com doze vírus. Foi considerado no passado como um gênero isolado. Atualmente está inserido no gênero *Phlebovirus* por apresentar significantes relações antigênicas e seqüência de proteínas homólogas com os vírus desse gênero, quando comparado com os membros dos outros gêneros (Murphy *et al.*, 1995).

2.2.1.3. *Phlebovirus* na Amazônia brasileira

Nessa região, foram isolados 21 membros do grupo *Phlebotomus* (Vasconcelos *et al.*, 1998). Desse total, quatro foram obtidos de amostras de sangue de seres humanos com doença febril aguda e os demais foram isolados de marsupiais, roedores, flebotomíneos (*Lutzomyia*) e mosquitos (*Culex* e *Coquillettidia*) (Travassos da Rosa *et al.*; Rodrigues *et al.*, 1998). Um fato importante é que até o momento todos os quatro vírus isolados de seres humanos, quais sejam CDU, ALE, Serra Norte e Morumbi pertencem ao mesmo complexo antigênico, CDU (Vasconcelos *et al.*, 1992). Registre-se ainda, dentro deste complexo o vírus Itaituba, isolado uma única vez do sangue de um marsupial *Didelphis marsupialis* (Rodrigues *et al.*, 1998).

Dentre os 17 outros membros do grupo cujo poder patogênico para o homem continua desconhecido, encontram-se os vírus Belterra e Icoaraci que apresentam forte relacionamento antigênico com o vírus RVF (Travassos da Rosa *et al.*, 1983). O arbovírus RVF foi identificado pela primeira vez na África, em 1930,

onde vem demonstrando seu alto poder patogênico para o homem e animais domésticos, muito bem documentado através de trabalhos publicados ao longo dos anos e que revelam desde quadros agudos benígnos a quadros complicados evoluindo com seqüelas ou com óbitos (Van Velden *et al.*, 1977; Abdel-Wahb & El Baz, 1978; Laughlin *et al.*, 1979; Deutman & Klomp, 1981; Nicoletti *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1994).

2.2.1.4. Vírus Morumbi

Esse vírus foi isolado em 1988 do sangue de um paciente, apresentando quadro agudo de doença febril, procedente da localidade de Novo Repartimento, Município de Tucuruí 49°, 41' O e 3°, 45' S, Estado do Pará. Os testes sorológicos utilizados para identificação do isolado, demonstraram que esse vírus pertence ao complexo CDU do grupo Phlebotomus. Embora já caracterizado antigenicamente, o vírus Morumbi, ainda não foi registrado no Catálogo Internacional (Rodrigues *et al.*, 1998).

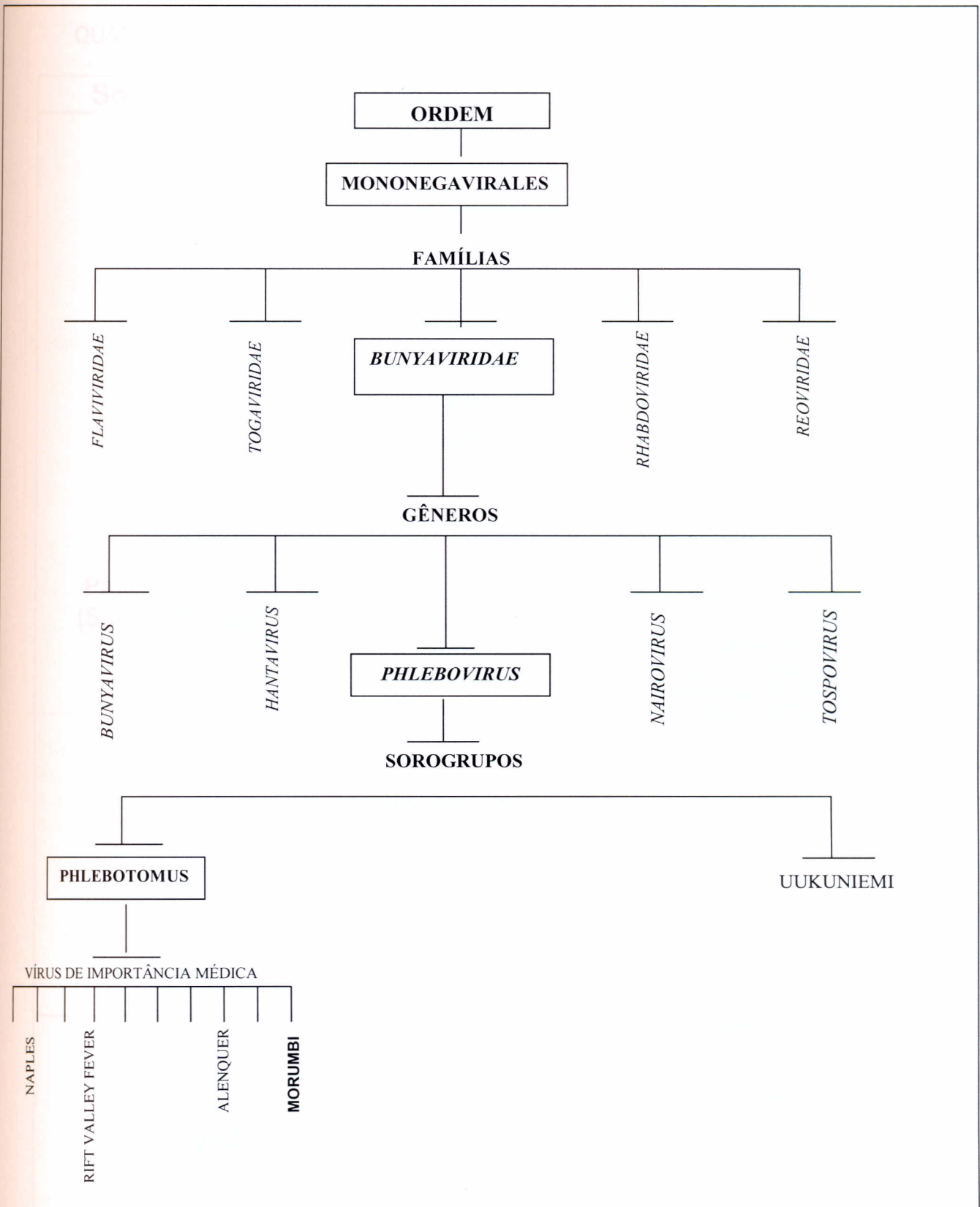


FIGURA 1 – Situação taxonômica dos vírus do Grupo Phlebotomus, destacando o vírus Morumbi.
FONTE: Adaptado de MURPHY *et al.*, 1995.

QUADRO 1 - Distribuição antigênica dos *Phlebovirus* em grupos e complexos

Sorogrupo	Complexo	Vírus
Phlebotomus (Sandfly fever)	Bujaru	Bujaru (BUJV) Munguba (MUNV)
	Candiru	Candiru (CDUV) Alenquer (ALEV) Itaituba (ITAV) Nique (NIQV) Oriximina (ORXV) Turuna (TUA)
	Chilibre	Cacao (CACV) Chilibre (CHI)
	Frijoles	Frijoles (FRIV) Joa (JOAV)
	Punta Toro	Buenaventura (BUEV) Punta Toro (PTV)
	Rift Valley	Rift Valley (RVFV) Arbia (ARBV) Belterra (BELTV) Icoaraci (ICOV) Karimabad (KARV)
	Salehabad	Salehabad (SALV) Naples (SFNV) Tehran (TEHV) Toscana (TOSV)
	Não Grupados	Aguacate (AGV) Anhangá (ANHV) Arboledas (ADSV) Arumowont (AMTV) Caimito (CAIV) Chagres (CHGV) Corfu (CFUV) Gabek Forest (GFV) Gordil (GORV) Itaporanga (ITPV) Ordrenisrou (ODRV) Pacui (PACV) Rio Grande (RGV) Saint-Floris (SAFV) Sicilian (SFSV) Urucuri (URUV)
Uukuniemi	-	EgAn 1825-61 (EGAV) Fin V-707 (FINV) Grand Arbaud (GAV) Manawa (MWAV) Murre (MURRV) Oceanside (OCV) Ponteves (PTVV) Precarious Point (PPV) St Abbs Head (SAHV) RML 105355 (RMLV) Uukuniemi (UUKV) Zaliv Terpeniya (ZTV)

FONTE: Adaptado de MURPHY *et al.*, 1995.

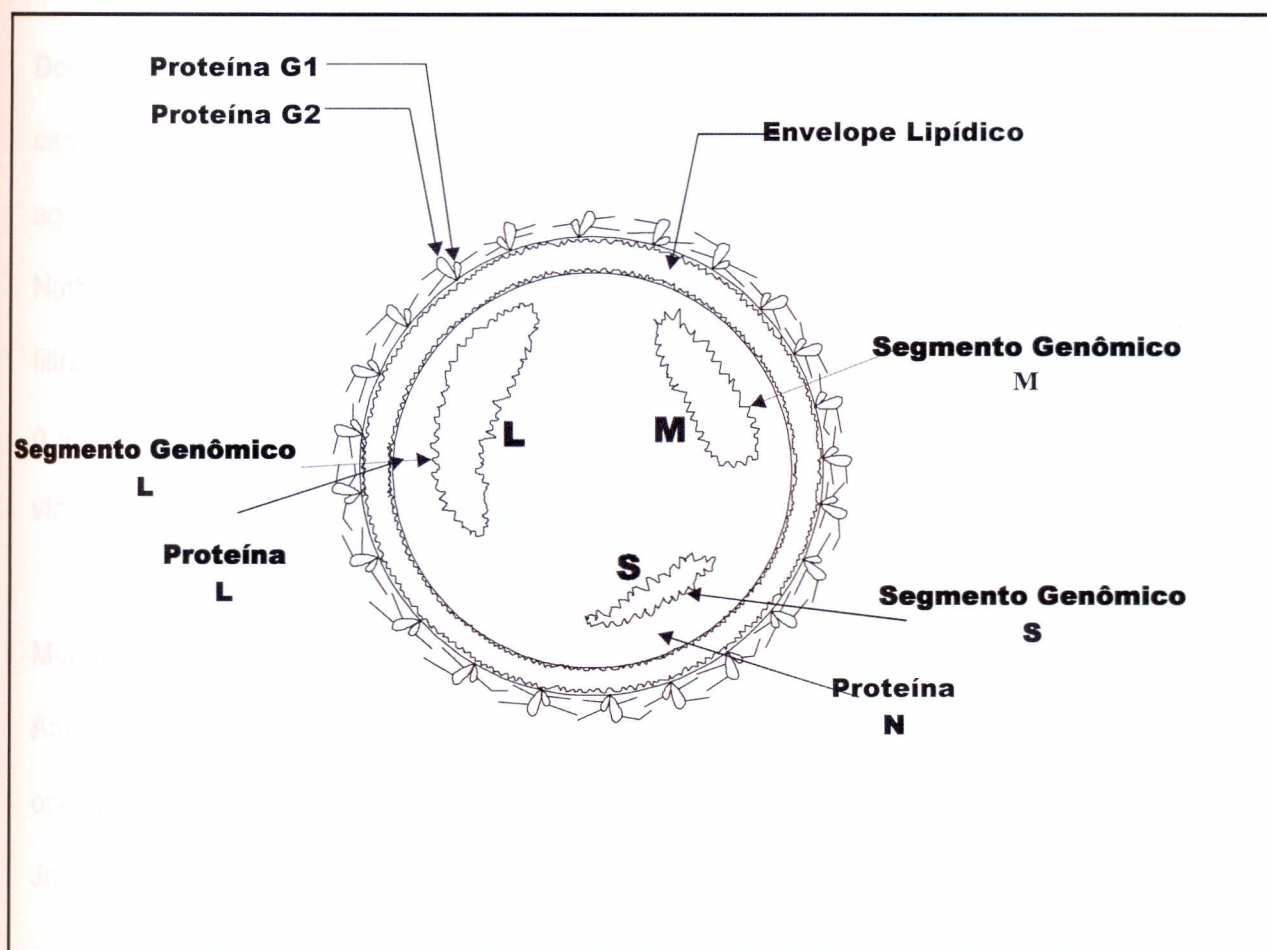


FIGURA 2. Esquema da partícula íntegra dos *Phlebovirus*. Observar a presença de espículas superficiais por glicoproteínas (G1 e G2) emergentes do envelope lipídico e a presença de três segmentos genômicos helicoidais e complementares.

Fonte: Adaptado de SCHMALJOHN, C.S.; 1996

2.3. FEBRE DO PHLEBOTOMUS

2.3.1. Histórico

As primeiras informações sobre a febre do *Phlebotomus* surgiram com a descrição clínica de uma doença feita por Pick em 1886, em Herzegovina, cuja característica principal era congestão conjuntival (citado em Schwarz *et al.*, 1995b) e com aparecimento da febre do Mediterrâneo, doença identificada durante a guerra de Napoleão (citado em Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996).

Sanford : Maiores informações sobre essa doença surgiram em 1909, quando Doerr, Frans e Taussing trabalhando juntos em uma comissão, inocularam soros de casos agudos em voluntários humanos e conseguiram reproduzir a doença cujo agente etiológico ainda era desconhecido (citado em Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996). Esses autores, no entanto, descobriram tratar-se de agente filtrável, que foi identificado mais tarde por Sabin & Sweet em 1943 quando isolaram o vírus SFS, na Itália, de soro coletado de dois soldados, tornando-se então, este vírus, o protótipo do agente etiológico da doença (citado em Tesh *et al.*, 1976).

Wick : Os estudos sobre esses vírus ficaram restritos aos países do Velho Mundo até 1960, quando a doença foi diagnosticada pela primeira vez no Continente Americano, no Panamá, em pessoas que estiveram em áreas de florestas. Na oportunidade, foram isolados e identificados os vírus Chagres e PT (Srihongse & Johnson, 1974; Monath, 1992).

Wick : No Brasil, os primeiros informes sobre a possibilidade da existência da doença surgiram em 1960, quando do isolamento de um *Phlebovirus*, denominado CDU, a partir de amostra de sangue de ser humano sintomático, apresentando quadro febril. Exames sorológicos posteriormente realizados em 1.710 residentes da Amazônia, demonstraram, em 11, a presença de anticorpos específicos para esse vírus (McLean, 1972; Karabatsos, 1985; Travassos da Rosa *et al.*, 1986).

2.3.2. Aspectos epidemiológicos

Wick : A doença constitui problema de saúde pública no Velho Mundo, onde além das epidemias, há ocorrência de casos esporádicos em áreas consideradas endêmicas como África, Mediterrâneo Europeu e Ásia Central (Tesh, 1990;

Sanford, 1994). No Mediterrâneo Europeu, os agentes etiológicos mais freqüentemente associados a essa doença são: SFS, SFN e TOS (Niklasson & Eitrem, 1985; Eitrem *et al.*, 1990), sendo que na Ásia predominam SFS e SFN (Gonzalez Scarano & Nathanson, 1996) e na África: RVF (Wilson *et al.*, 1994). A prevalência para SFS, SFN e TOS foi estudada em Chipre na população nativa saudável (Eitrem *et al.*, 1991b) que apresentou taxas de anticorpos em torno de 57%, 32% e 20% para SFN, SFS e TOS, respectivamente, demonstrando assim, ser bastante elevada a infectividade entre os residentes. Nessas regiões, existe ainda risco para os viajantes, como soldados suecos que estiveram em manobras militares por seis meses em Chipre (Eitrem *et al.*, 1990) ou os turistas em Chipre (Niklasson & Eitrem 1985), ou em Toscana, na Itália (Schwarz *et al.*, 1995a e Schwarz *et al.*, 1995c), ou em Albufeira e Coimbra, Portugal (Ehrnst *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1995c), na Espanha (Eitrem *et al.*, 1991a). Merece destaque o estudo de Eitrem *et al.*, (1991a) que encontraram 37 pessoas infectadas em um total de 127 turistas suecos que voltaram do Mediterrâneo. Neste estudo, chamou atenção dos pesquisadores a existência de uma senhora infectada, na 12ª semana de gestação, que deu à luz mais tarde a uma criança saudável.

Ainda no Velho Mundo, registra-se um quarto vírus que vem chamando atenção das autoridades sanitárias não só por ser responsável por epidemias, mas por seu alto poder patogênico para o homem, o RFV, que foi identificado as proximidades do vale do Rio Rift, no Quênia em 1930, onde comprometia predominantemente animais ruminantes levando muitas vezes as fêmeas gestantes a perderem suas crias (Laughlin *et al.*, 1979). Desde então, foi observado que além dos animais, o homem também poderia ser infectado, quando em contato com esse vírus, o que ficou bastante evidente durante uma epizootia ao sul da África, no

período de 1950-1951, quando cinco pessoas foram infectadas ao assistirem a necrópsia de animais mortos por esse vírus. (Laughlin *et al.*, 1979). Epidemias, nessa região, foram registradas ainda em 1975 e 1977 (Van Velden *et al.*, 1977; Laughlin *et al.*, 1979). No Oeste africano, região da Mauritânia, em 1987, ocorreu uma grande epidemia, ocasião em que os estudos epidemiológicos registraram 1.264 infecções humanas com 224 mortes relatadas (Arborio & Hall, 1989). Em 1993, durante os meses de abril e outubro, evidenciaram-se epidemias pelo RFV no Egito e na Mauritânia, com aproximadamente 250 óbitos registrados (Wilson *et al.*, 1994). No mesmo ano, o Senegal foi acometido por uma grande epidemia na qual foram relatados novos vetores capazes de transmitir o vírus RFV: *Aedes ochraceus* e *Ae. vexans*, com 13 isolamentos virais, grande número de casos de infecção humana e diversos óbitos (Fontenille *et al.*, 1998). Apesar de não haver registros sobre a circulação dessas duas espécies de Culicídeos no continente Sul Americano, é preocupante a possibilidade da entrada desse agente infeccioso nas Américas, particularmente no Brasil, face às evidências da transmissão do vírus pelo *Ae. aegypti* e dos altos índices de infestação deste mosquito no país (Karabatsos, 1985).

A ocorrência da doença no Velho Mundo dá-se no período de maio a outubro em Chipre (Eitrem *et al.*, 1991a) correspondendo às estações quentes e secas, (Sanford, 1994). As epidemias aparecem essencialmente nas áreas endêmicas e chamam atenção pois afetam os recém-chegados, atingindo em algumas ocasiões um grande número dessas pessoas de uma só vez. Este fato, leva a pensar que os nativos dessas áreas se infectam ainda bem jovens e como os sintomas nessa idade, costumam ser discretos, passam despercebidos (Tesh & Papaevangelou, 1977a; Tesh, 1990; Eitrem *et al.*, 1991b).

No velho Mundo, os vírus SFS e SFN são transmitidos ao homem através do *Phlebotomus papatasi*, enquanto *Ph. perniciosus* é o transmissor do vírus TOS (Eitrem *et al.*, 1991b).

No Continente Americano, a febre do Phlebotomus vem sendo registrada no Panamá (Leduc *et al.*, 1982; Sanford, 1994) e na Região Norte do Brasil (Vasconcelos *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 1998). Nesta, a infecção em humanos por esses arbovírus ainda é baixa, segundo Travassos da Rosa *et al.*, (1986) e Vasconcelos *et al.*, (1998). No Panamá, ao contrário, os índices de infectividade aparecem bastante elevados, conforme Srihongse & Johnson (1974) que encontraram 18% de testes sorológicos positivos para o vírus Chagres, em residentes de San Miguel, umas das Ilhas Perlas.

Na América do Norte, Colômbia e Região Sudeste do Brasil, (Estado de São Paulo), a febre do Phlebotomus ainda não foi registrada nos seres humanos, muito embora a existência de arbovírus desse grupo já esteja muito bem documentada por estudos sorológicos e isolamento de vírus de alguns vertebrados (Calisher *et al.*, 1977; Travassos da Rosa *et al.*, 1986; Tesh *et al.*, 1989).

Na Amazônia brasileira, a febre do Phlebotomus está relacionada a quatro sorotipos: CDU, ALE, Serra Norte e Morumbi. Além destes, outros membros já foram isolados e estudados, no entanto, ainda hoje é desconhecido seu poder patogênico para o homem, pelo fato de terem sido obtidos apenas de isolamento de flebotomíneos ou animais silvestres (Travassos da Rosa *et al.*, 1986; Vasconcelos *et al.*, 1992; Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

A infecção humana ocorre na natureza mediante picada por flebotomíneos infectados (Tesh *et al.*, 1982). No entanto, o arbovírus RVF é capaz de infectar ainda, através de aerossóis, como observado durante estudos em

laboratório e durante o manuseio de carne fresca de animais domésticos infectados (Laughlin *et al.*, 1979; Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996).

Todos os vírus isolados de flebotomíneos do Velho Mundo provêm de insetos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, enquanto aqueles do Novo Mundo são oriundos de insetos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. Embora existam outros gêneros, esta associação vírus-inseto, é sem dúvida o reflexo da faixa de hospedeiros vertebrados desses vírus, das preferências alimentares e distribuição geográficas dos vetores. Por exemplo, a faixa de hospedeiros vertebrados correntemente conhecida dos *Phlebovirus* parece ser limitada aos mamíferos, e a maioria dos flebotomíneos que se alimentam dos mamíferos, são membros dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Tesh, 1988).

Dos 39 sorotipos de *Phlebovirus* reconhecidos, 25 têm sido isolados nas Américas, provavelmente um reflexo da grande diversidade de flebotomíneos, com, aproximadamente, 360 espécies diferentes de *Lutzomyia* atualmente reconhecidas, enquanto somente 119 espécies e subespécies de *Phlebotomus* têm sido reportados no Velho Mundo (Tesh, 1988).

Estudos realizados no Panamá já demonstraram o envolvimento da espécie *Lutzomyia trapidoi* na transmissão do vírus PT (Tesh *et al.*, 1974). Na Amazônia brasileira, foram isolados membros do sorogrupo *Phlebotomus* de *Lutzomyia flaviscutellata* (Aitken *et al.*, 1975), *Lutzomyia umbratilis* (Hervé *et al.*, 1986, Travassos da Rosa *et al.*, 1986) e *Lutzomyia olmeca* (Tesh *et al.*, 1989). Evidências de que artrópodes são os seus transmissores podem ser comprovadas pelo encontro de soropositividade em humanos para os vírus isolados dos insetos (Karabatsos, 1985).

Os invertebrados implicados na transmissão de *Phlebovirus* possuem hábitos peridomiciliares no Velho Mundo (White & Fenner, 1994) e são encontrados tanto em áreas urbanas como em áreas rurais, o que difere da ocorrência nas Américas onde os flebotomíneos são encontrados em zonas de florestas. Já está comprovado que durante os meses de inverno, quando o vetor é inativo e durante o período em que hospedeiros vertebrados não estão disponíveis, os vírus se mantêm em natureza através da passagem transovariana, inclusive mantendo-se por longos períodos como 23 meses, não alterando seu poder patogênico (Tesh *et al.*, 1986; Tesh & Modi, 1987). A transmissão transovariana está muito bem documentada através de estudos desenvolvidos em laboratórios, com ovos de artrópodes infectados (Hervé *et al.*, 1984; Tesh & Modi, 1987), ou através do encontro de grande número de flebotomíneos machos infectados em natureza com vírus, quando se tem conhecimento que somente as fêmeas são hematófagas e que só elas por isso deveriam aparecer infectadas (Schmidt *et al.*, 1971; Tesh *et al.*, 1974; Aitken *et al.*, 1975; Tesh *et al.*, 1989).

Woodall (1967) observou que, além dos flebotomíneos, outros insetos como os mosquitos, estariam implicados no ciclo de infecção dos *Phlebovirus*. Tesh (1988) reforçou essa idéia quando relacionou os vírus Arumowot, Itaporanga e o RVF na transmissão efetuada por mosquitos.

2.3.3. Aspectos clínicos e laboratoriais

Na infecção natural causada pelos *Phlebovirus* predomina o quadro clínico de doença autolimitada, com duração de 2 a 4 dias, podendo variar desde forma inaparente, quadro febril, doença febril com artrite, até quadros mais graves

de encefalite e febre hemorrágica. A doença aguda febril é responsável pelo afastamento das pessoas infectadas de suas atividades habituais devido, inicialmente a elevação de temperatura que pode variar de 37,7°C a 40°C. A febre freqüentemente é acompanhada de cefaléia, dor retrobital, além de mialgia que pode localizar-se no toráx ou no abdome. Sintomas menos freqüentes são náuseas, vômitos, fotofobia, instabilidade da marcha, rigidez de nuca, alteração ou perda do apetite e artralgia. Em um terço dos pacientes aparece congestão conjuntival. A freqüência do pulso pode estar aumentada proporcionalmente à temperatura no primeiro dia, porém nos dias posteriores, com freqüência ocorre bradicardia. A febre persiste por três dias na maioria dos pacientes, com defervescência gradual, instabilidade da marcha, astenia e sentimentos de depressão, encontrados com freqüência durante a convalescença. Em 15% dos casos ocorre recorrência dos sintomas subsequente ao desaparecimento das manifestações da fase aguda (Sanford, 1994). Reação semelhante tem sido observada no curso de infecções causadas pelo *Bunyavirus* Oropouche, importante agente etiológico de epidemias e doença febril na Amazônia brasileira e peruana. Os sintomas observados nas pessoas infectadas com os seis tipos de *Phlebovirus* que infectam o homem, no Continente Americano, não diferem daqueles observados em outras áreas do mundo (Sanford, 1994, Pinheiro *et al.*, 1986; Vasconcelos *et al.*, 1998).

espor: Bartelloni & Tesh (1976) verificaram quadro benigno similar nas pessoas previamente saudáveis, infectadas experimentalmente com o vírus SFS. Esses autores observaram ainda que era possível ocorrer, em alguns casos, resistência natural à infecção, situação em que não eram observados nem sinais clínicos, nem anticorpo protetor.

Quadros graves da doença são observados apenas nas infecções com os vírus TOS e RVF, responsáveis pelo aparecimento de complicações no sistema nervoso central, com aparecimento de meningite asséptica e meningoencefalite. Esta pode evoluir com seqüela do tipo paralisia como já registrado por Laughlin *et al.*, (1979) na África com o RVF e, mais recentemente observadas em pessoas que realizaram viagens para áreas endêmicas do vírus TOS como dois alemães que estiveram na Itália (Schwarz *et al.*, 1995a) ou como alguns suíços que estiveram em viagens por Chipre, Espanha e Portugal (Ehrnst *et al.*, 1985; Eitrem *et al.*, 1991a). Ao realizarem estudos sobre doença do sistema nervoso produzida pelo vírus TOS, Schwarz *et al.*, (1995a), observaram que até aquele momento todos os casos registrados de encefalite e meningite asséptica por esse vírus foram vistos em adultos, o que fazia supor que crianças não eram afetadas ou apresentavam infecções leves ou inaparentes. No entanto em 1998, Braiton *et al.*, relataram 14 casos de crianças, com infecção no sistema nervoso central pelo vírus TOS.

Além da complicação para o sistema nervoso central, o RVF está associado com aparecimento de icterícia e quadros hemorrágicos (Laughlin *et al.*, 1979; WHO, 1985; Arborio & Hall, 1989) que levam a sangramentos, de discreta a intensa gravidade. Estas alterações podem ser detectadas logo no início do quadro através de exame de coagulograma. A hemorragia leve pode ocorrer de forma espontânea ou induzida através do teste do torniquete com aparecimento de petéquias na pele. A hemorragia intensa profusa pode provocar quadro grave, com grandes perdas de sangue do organismo como melena (Laughlin *et al.*, 1979).

Outros achados relacionados ao RVF são casos de retinite, que podem ou não evoluir com perda parcial da visão (Laughlin *et al.*, 1979).

Os achados laboratoriais, tanto na infecção natural, como na experimental com o sorotipo SFS em humanos revelam inicialmente leucopenia intensa, às custas de linfopenia seguida de neutropenia prolongada (Tesh, 1990).

Nas formas complicadas, com comprometimento do sistema nervoso central, o exame do líquido cefaloraquidiano demonstra pleiocitose, com grande número de mononucleares (Sanford, 1994; Schwarz *et al.*, 1995a).

No comprometimento do globo ocular, o exame de fundo de olho poderá revelar exsudato ao nível da mácula acompanhado de hemorragia, como observado por Laughlin *et al.*, (1979).

O diagnóstico da doença, durante a fase aguda, poderá ser realizado através do exame sorológico, por método imunoenzimático ou imunofluorescência para detecção de IgM específica, a partir de soro do paciente infectado, colhido após o sexto dia de doença, ou ainda, através da soroconversão quando uma segunda amostra de soro, colhida uma semana após a colheita da primeira, poderá revelar a elevação dos títulos de anticorpos em pelo menos quatro vezes em relação à primeira amostra, ou ainda, a viragem de negativo para positivo (Tesh, 1988).

O isolamento do vírus pode ser obtido a partir de sangue total, soro, plasma e líquido cefaloraquidiano. A colheita do espécime deverá ser realizada nos seis primeiros dias de doença. Na ocorrência de óbito, utilizam-se fragmentos de tecido hepático e do SNC para as tentativas de isolamento. Soluções obtidas das amostras são inoculadas em camundongos albinos de 2 a 3 dias de nascimento ou em cultivos celulares de preferência aqueles constituídos de células Vero (células de rim de macaco verde africano) e de flebotomíneos. Para confirmação do isolamento viral são efetuadas técnicas de imunofluorescência, neutralização e fixação de complemento (Tesh, 1988, Schwarz *et al.*, 1995a).

A imunidade produzida por *Phlebovirus* pode ser observada mediante a realização de testes sorológicos, onde são detectados anticorpos específicos para os vírus causadores das infecções. A imunidade é espécie-específica não sendo desenvolvida a proteção para os demais tipos de vírus do mesmo sorogrupo. Este fato determina que o indivíduo residindo ou visitando, com frequência, zonas endêmicas para os vírus do grupo febre do Phlebotomus, poderá infectar-se mais de uma vez, como comprovam os estudos sorológicos, realizados por Eitrem *et al* (1991b) no Chipre, onde encontraram mais de 70% da população nativa com anticorpos neutralizantes para os vírus SFS, SFN e TOS.

2.3.4. Terapêutica, prevenção e controle

A inexistência de vacina ou agente quimioterápico específico contra o agente causal dessa doença em humanos determina que, nos casos benígnos, a terapêutica seja estritamente sintomática e, na ocorrência de complicação acompanhada de hemorragia e choque, é imperativa a exsanguíneo transfusão (Tesh,1990).

Em trabalho experimental, Sidwell *et al.*, (1988) utilizaram a Ribavirina em camundongos inoculados com o vírus PT. A droga foi administrada por via subcutânea duas vezes ao dia, por cinco a sete dias, iniciando 4h pré-inoculação e estendendo-se até 24h ou 36h pós-inoculação viral, com um mínimo de dose efetiva de 4,7 mg/Kg por dia. Os autores observaram aumento da sobrevida dos animais além da redução dos títulos de aminotransferases no soro, resultante da inibição da infectividade do vírus no soro desses animais.

Medidas de prevenção ainda não estão definidas. Sabe-se, no entanto, que no Velho Mundo onde a ocorrência da infecção dá-se em áreas com elevada densidade demográfica, a utilização de inseticidas nessas áreas é responsável pela redução da quantidade de vetor e diminuição da incidência da doença. Este fato foi comprovado pelo trabalho de Tesh & Papaevangelou (1977a) que observaram em Atenas, Grécia, que depois da instalação de um programa para uso de inseticida (DDT) em área endêmica para flebotomíneos, ocorreu a redução para 4% e até mesmo o desaparecimento dos níveis de anticorpos para os vírus SFS e SFN nos residentes menores de 29 anos, quando comparados com os residentes maiores de 30 anos que apresentavam prevalência de anticorpos de 36% e 13% para esses vírus, respectivamente. No Continente Americano, medidas preventivas ainda não foram instituídas, visto que até o presente, todos os *Phlebovirus* associados com doença humana foram casos isolados de pessoas residentes ou que estiveram em zonas de floresta, onde a circulação viral se mantém restrita (Srihongse & Johnson, 1974; Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

hepático Ainda que, de um modo geral, a doença clássica apresente-se como um quadro leve, autolimitado, é preciso levar em consideração que os sintomas obrigam muitas pessoas a se afastarem de suas atividades físicas habituais, para guardarem repouso. Em caso de epidemia isto pode ser a causa de um impacto na economia de uma região como já acontece atualmente no Brasil, em especial em áreas da região Norte, com outras arboviroses, como aquelas causadas pelos vírus Mayaro, Dengue, Oropouche e Febre amarela (Vasconcelos *et al.*, 1992) ou de mudança de estratégia militar, quando a doença afeta soldados em zonas de conflitos (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996).

2.3.5. Aspectos anátomo - patológicos

Informações sobre a patogenia e patologia da doença induzida pela maioria dos *Phlebovirus* de importância médica são escassas, em face desses arbovírus produzirem quadros de doença benigna na maior parte dos casos relatados (Tesh, 1990). No entanto, mais recentemente foram publicados diversos trabalhos envolvendo o vírus RVF, devido à ocorrência de casos de óbitos, com posterior realização de necrópsia, o que serviu de substrato para os primeiros estudos anátomo-patológicos em humanos (Van Velden *et al.*, 1977; Abdel - Wahab & El Baz, 1978; Laughlin *et al.*, 1979; Arborio & Hall, 1989; Gonzalez – Scarano & Nathanson, 1996).

Com efeito, a necrópsia completa deve ser considerada mandatória nos casos graves com evolução letal, como ocorre na infecção humana pelo vírus RVF. Este procedimento também vem sendo realizado em animais domésticos, quando são observadas graves lesões hemorrágicas, com intenso comprometimento hepático que, à microscopia revela necrose extensa do parênquima e surgimento de grande número de corpúsculos apoptóticos, tipo Councilman – Rocha Lima (Laughlin *et al.*, 1979; Gonzalez – Scarano & Nathanson, 1996).

2.3.6. Modelos experimentais

2.3.6.1. Voluntários humanos.

Para um melhor entendimento sobre o comportamento dos *Phlebovirus* ligados à doença benigna, trabalhos experimentais foram realizados no passado.

Assim, Sabin (1948), após inocular 100 voluntários humanos com diferentes amostras do vírus da febre do *Phlebotomus*, como era denominado, descreveu detalhadamente o quadro clínico da doença.

trabalhos Bartelloni & Tesh (1976) observaram tanto presença como ausência de infecção, quando inocularam 20 voluntários humanos com 0,5ml, por via intravenosa, com soro humano infectante para o vírus SFS. Os voluntários constituíram quatro grupos com cinco pessoas, com uma diluição específica para cada grupo, seguindo a seguinte ordem: sem diluição, diluído a 1:10, diluído a 1:100 e diluído 1:1000. A detecção de anticorpo específico foi comprovada por viragem sorológica, evidenciada em 17 dos 20 voluntários. O trabalho serviu para confirmar a infectividade do vírus por essa via e proporcionou ainda, observar respostas humanas semelhantes ao quadro já descrito para a infecção natural com este vírus. O estudo propiciou ainda demonstrar que DL_{50} do soro humano original de 0,0013ml era a dose infectante para seres humanos, corroborando ao achado anterior de Sabin que observou ser a dose mínima do soro infectante do vírus SFS para uma pessoa adulta, aproximadamente 0,001ml.

trabalhos Segundo Tesh (1990), experimentos com voluntários humanos, inoculados por via subcutânea com soro humano contendo *Phlebovirus*, revelaram período de incubação variável de 3 a 6 dias e imunidade específica, além de duradoura para a espécie de vírus inoculado, não protegendo o indivíduo contra futuras infecções, com outros membros do mesmo sorogrupo.

2.3.6.2. Primatas não Humanos

Ao lado de experimentos com humanos, foram desenvolvidos ainda, trabalhos experimentais em animais. Assim, Behbehani *et al.*, (1967), utilizando macacos *Rhesus*, observaram a presença de febre em dois de seis animais quando foram inoculados com o vírus SFS por via intracerebral (IC) e intramuscular (IM). Observaram ainda, nesses animais, sinais clínicos neurológicos como tremores e tonturas durante a fase inicial da doença. O exame histopatológico posterior não revelou lesões no sistema nervoso central e medula espinhal, nos animais inoculados com o vírus SFS por via IC, bem como por via intramuscular.

Um outro estudo sobre a infectividade e o poder patogênico do vírus SFS em macacos *Cynomolgus sp* demonstrou que os animais apresentavam infectividade, porém sem sinais clínicos ao vírus quando inoculados tanto por via intramuscular como por via intravenosa, utilizando três suspensões de origem variadas do vírus. Biópsias do tecido muscular da área de inoculação viral não permitiram detecção imuno-histoquímica de antígenos virais, nove e 20 dias após a inoculação (McClain *et al.*, 1997).

2.3.6.3. Camundongos

Além dos humanos e macacos, outros animais vêm sendo utilizados em experimentos com *Phlebovirus*, no Continente Americano. Estudos envolvendo camundongos C57 BL/6J, inoculados com vírus PT por via subcutânea, revelaram tendência para o aparecimento de necrose hepatocelular extensa, que invariavelmente levava à morte em quatro dias quando eram utilizados

camundongos com menos de cinco semanas de vida. No entanto, quando utilizaram para o mesmo tipo de experimento camundongos com oito semanas de vida os pesquisadores verificaram que 95% desses animais conseguiram eliminar o vírus da circulação, após uma infecção de 48 horas e que isso ocorria devido à presença de interferon no organismo desses animais (Pifat & Smith 1987).

PVF em CD No IEC em colaboração com a Universidade Federal do Pará (UFPA), pesquisadores ao desenvolverem estudo piloto, infectaram experimentalmente camundongos albinos Swiss recém-nascidos com vírus CDU, Morumbi e ITA, verificando lesões semelhantes no fígado e também no cérebro, levando os animais invariavelmente à morte em 4 e 5 dias, quando inoculados por via intracerebral. As lesões hepáticas encontradas caracterizavam-se pela presença de necrose focal, com aparecimento de corpúsculos acidófilos, mais freqüentes no segundo dia pós-inoculação, além da presença de focos de neutrófilos. No terceiro dia observaram declínio das lesões e no quarto e quinto dia pós-inoculação, as lesões eram ainda mais escassas predominando esteatose e balonização. No sistema nervoso central, em especial no cérebro, a lesão no terceiro dia pós-inoculação apresentava-se constituída por edema difuso e vacuolização do citoplasma celular. A evolução para a necrose dos neurônios podia ser observada, através da cromatina nuclear dispersa com figura de picnose e cariorrexe. No quarto e quinto dia o edema era intenso, e acompanhou-se de necrose de grandes números de neurônios, com neuroniofagia e/ou basofilia do citoplasma neuronal e cariorrexe, (Araújo M.T., comunicação pessoal, 1994).

Todos os trabalhos relatados mostraram o extremo cuidado dos pesquisadores em utilizar em seus experimentos, sorotipos virais relacionados com doença humana benígna, o que dispensou o uso de laboratórios especiais, com

resultados importantes sobre esses arbovírus, permitindo inclusive observar que o aparecimento de hepatite grave em camundongos inoculados com *Phlebovirus* PT está diretamente relacionado ao nível baixo de interferon, observado através da imunossupressão induzida por uso de drogas (Pifat & Smith, 1987).

Apesar dos riscos de infecção para o pesquisador, com manuseio do RVF em laboratório, ele foi usado por Peters & Slone (1982), em um estudo envolvendo animais, quando verificaram diferentes respostas para infecção experimental com três diferentes doses de suspensão deste vírus, quando utilizaram linhagem consangüínea de camundongos. Um grupo que morreu 3 a 5 dias após inoculação evoluiu com necrose hepática extensa com apenas 5 unidades formadoras de placas (PFU), outro grupo resistiu à infecção subcutânea com 5×10^5 (PFU) e o terceiro grupo apresentou moderada susceptibilidade aos efeitos letais de 5×10^3 e 5×10^5 PFU do vírus, morrendo 2 a 3 semanas com encefalite, depois de inoculados. Aqueles autores concluíram que a resposta clínica dos camundongos assemelha-se às apresentações da doença benígna, encefalite ou doença hepática fulminante no humano, o que poderia sugerir segundo eles, que a resposta à doença estaria associada a um fator genético (Peters & Slone, 1982).

3. JUSTIFICATIVA

Na Amazônia Brasileira, 21 diferentes sorotipos do grupo *Phlebotomus* já foram identificados. Dentre estes, quatro são comprovadamente patogênicos para o homem, sendo a infecção humana demonstrada através do isolamento do agente a partir do sangue de doentes. A doença causada por esses vírus é caracterizada por um quadro febril agudo, de 2 a 5 dias de duração. Vale ressaltar, que um mesmo arbovírus pode determinar diferentes síndromes clínicas e, por outro lado, a mesma sintomatologia pode ser determinada por tipos diferentes de arbovírus.

A grande diversidade dos *Phlebovirus*, a inexistência de informações complementares para a maioria dos vírus pertencentes a este gênero e a possibilidade de ocorrência de epidemias no Brasil, são fatores que justificam o desenvolvimento de estudos no sentido de ampliar o conhecimento acerca desses agentes virais que circulam de modo silencioso na Amazônia Brasileira.

Como entre nós, vírus do complexo CDU, em especial o vírus Morumbi, foi demonstrado (em rara situação) associado à doença em humano, parece necessária a caracterização da infecção em modelo experimental para avaliar a importância de cada via de inoculação relacionando-a aos padrões histopatológicos de lesão hepática. A própria caracterização da lesão hepática seqüencial, utilizando a via IC, efetuada em apenas um estudo não publicado em nosso grupo de pesquisa, requer ainda novos estudos, especialmente agora que é possível sua comparação com achados de imuno-histoquímica.

A utilização da metodologia imuno-histoquímica é promissora para esclarecimento diagnóstico, em casos de infecção humana pelo vírus Morumbi e outros *Phlebovirus* com potencial evolução para hepatite grave. A detecção de

antígenos virais no próprio tecido poderá identificar mais diretamente sua distribuição nos diversos tipos celulares, destacando-se sua presença em células de Kupffer e/ou hepatócitos, permitindo avaliação de sua eventual relação com os tipos de lesão. Tal abordagem poderá ser especialmente relevante em áreas como a Região Amazônica, onde são freqüentes a ocorrência de óbito por febres hemorrágicas, por vezes com icterícia presumivelmente devidos à infecção por vírus que determinam no fígado, lesões histopatológicas atípicas, e por vezes semelhantes às encontradas pela infecção do vírus Morumbi nos animais de experimentação.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer as características anátomo-patológicas e imuno-histoquímicas em fígado de camundongos albinos Swiss recém-nascidos experimentalmente infectados pelo vírus Morumbi.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o vírus apresenta hepatotropismo diferenciado na dependência de inoculação pelas vias cerebral, peritoneal ou subcutânea.
- Caracterizar detalhadamente os padrões anátomo-patológicos seqüenciais no fígado.
- Demonstrar a localização do antígeno viral no tecido hepático ao longo da infecção experimental.
- Estudar possíveis inter-relações entre os achados anátomo-patológicos e os imuno-histoquímicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O inóculo utilizado no presente estudo, cedido pelo Serviço de Arbovírus do IEC, foi proveniente de cérebro de camundongos recém-nascidos infectados após três passagens com amostra protótipo, BE H 475236 do vírus Morumbi e mantido a - 70° C. A suspensão de cérebro foi preparada por maceração na proporção de 1:10 em PBS (solução fosfatada, tamponada pH 7,2) contendo 0,75% de albumina bovina e antibióticos. Em seguida, centrifugada a 2000g durante 10 minutos, e o sobrenadante colhido e inoculado em camundongos.

5.2. OBTENÇÃO DO LÍQUIDO ASCÍTICO IMUNE

O antissoro foi obtido através da inoculação de camundongo *Swiss* jovens (entre 20 a 40 dias de vida), por via intraperitoneal (IP), com 0,2 ml da suspensão de vírus a 10% em salina fisiológica (NaCl 0,85%). Foram feitas em média quatro imunizações semanais. Três dias após a quarta imunização aplicou-se 0,2 ml por camundongo, via IP de suspensão de 1:5 de sarcoma 180, em salina fisiológica. Sete dias após a quarta vacina, aplicou-se uma quinta, servindo como dose reforço. O líquido ascítico foi recolhido por punção IP com agulha n° 18 em uma seringa de 10 ml. Após a coleta, o líquido obtido foi centrifugado a 2.100g por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -20° C até ser usado. Este anticorpo reagiu com o vírus até a diluição de 1:64 por teste de fixação de complemento (Travassos da Rosa *et al.*, 1994).

5.3. DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO

Foram utilizados 120 camundongos albinos Swiss isogênicos recém-nascidos (dois a três dias) provenientes da Seção de Biotérios do IEC, que se apresentavam em perfeitas condições de saúde e foram distribuídos ao acaso em quatro grupos de 30 animais cada, em gaiolas separadas. O primeiro grupo identificado pela letra "A", não recebeu nenhuma suspensão e constituiu o grupo controle. O segundo grupo foi inoculado com a suspensão de 0,02 ml de vírus por via intracerebral e identificado como "IC". O terceiro grupo foi inoculado com quantidade de suspensão viral idêntica à anterior por via intraperitoneal e designado como "IP" e o quarto grupo foi inoculado com a suspensão de vírus por via subcutânea designado como "SC". Cada grupo foi subdividido em cinco subgrupos com seis animais cada que foram comparados com dois animais controle. Cada subgrupo e mais uma fêmea recentemente parida foram colocados em caixas separadas, de polipropileno com tampa de aço cromado, sendo os animais adultos alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Os animais inoculados e os não inoculados foram mantidos sob mesmas condições no biotério do IEC em ambiente refrigerado, à temperatura de 22° C. Todos os animais foram observados diariamente para acompanhamento da evolução da infecção. Tanto os animais do grupo de infectados como do grupo controle foram sacrificados sempre pela manhã, após as 10:00h.

Do total de 90 animais inoculados, 19 deles sofreram canibalismo e não fizeram parte do experimento final que ficou assim constituído: 21 animais inoculados por via IC, 21 pela via IP e 29 animais por via SC. Os animais inoculados foram sacrificados progressivamente a intervalos de 24 em 24h. Assim, dos animais

inoculados por via IC, grupo de seis animais foi sacrificado às 24h, 48h e 72h e um grupo de três sacrificados ao final de 96h constituindo assim os subgrupos IC24, IC48, IC72 e IC96, respectivamente. Para os animais inoculados através da via IP usou-se o mesmo procedimento: seis animais sacrificados às 24h, seis às 48h seis às 72h e três às 96h, constituindo assim os subgrupos de número IP24, IP48, IP72 e IP96. Para aqueles animais inoculados por via SC foi usado o mesmo processo: seis camundongos foram sacrificados às 24h, seis às 48h, seis às 72h, seis às 96h e cinco às 120h, constituindo os subgrupos SC24, SC48, SC72, SC96 e SC120, respectivamente (Figura 3). Os animais que constituíram o grupo controle foram sacrificados nos mesmos intervalos de tempo que os infectados.

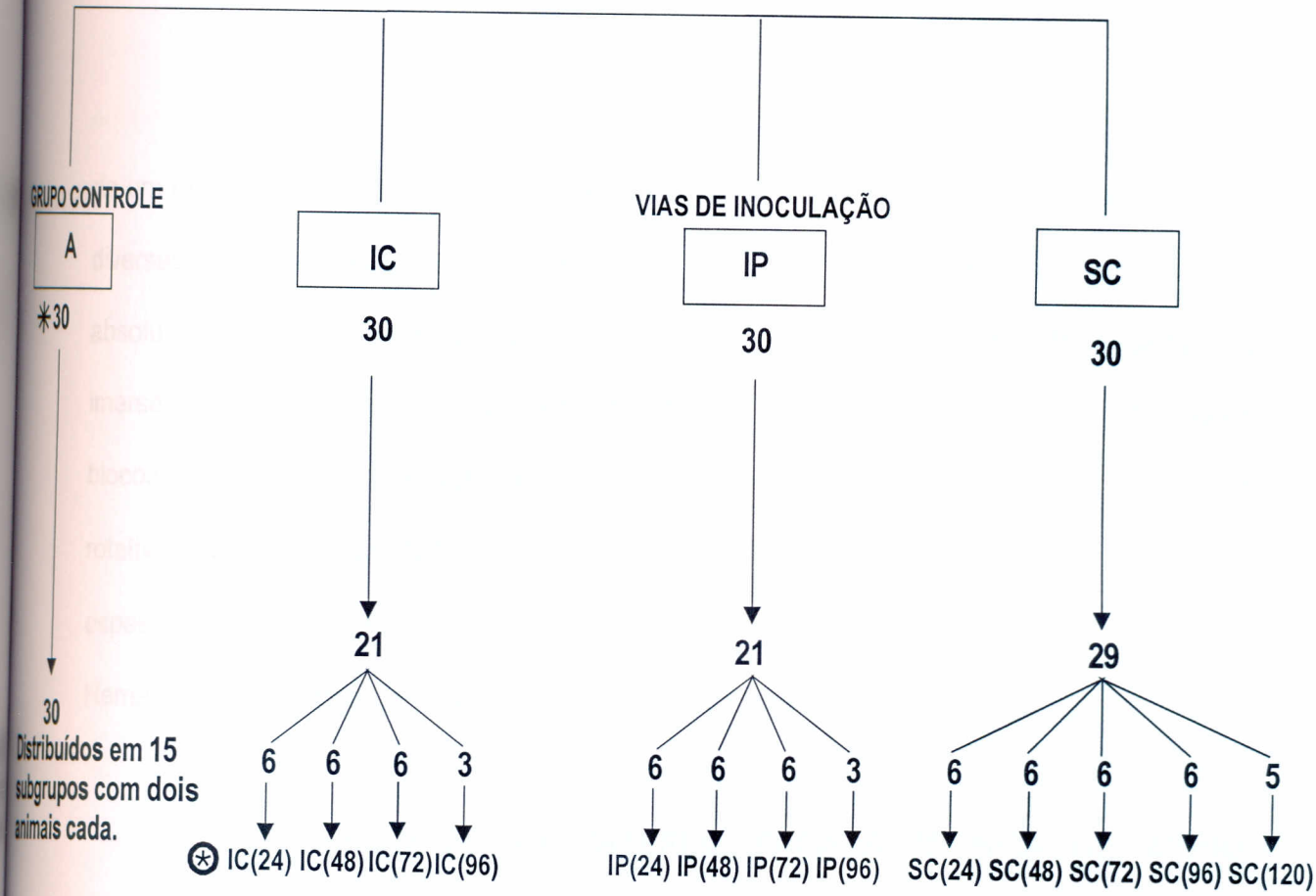
5.4. COLETA DO MATERIAL E PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Os inoculados e os animais controle foram sacrificados em separado, através do seccionamento dos vasos da região cervical, nos seguintes períodos: 24h, 48h, 72h, 96h para os animais inoculados por via IC, via IP e SC, sendo que nestes últimos também às 120h.

Após o sacrifício dos animais, foi feita uma incisão mediana abrangendo tronco e abdome para a retirada das vísceras para exame macroscópico e posterior fixação de todos os órgãos em formalina neutra tamponada a 10% (Anexo 1).

Fragmentos de fígado de todos os animais foram retirados para exame morfológico e para teste imuno-histoquímico.

EXPERIMENTO



LEGENDA: IC= Intracerebral; IP= Intraperitoneal; SC= Subcutânea; ⊛ = Via de inoculação e horas

* Número de animais trabalhados

FIGURA 3. Distribuição dos grupos e subgrupos durante o experimento.

5.5. PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Os fragmentos hepáticos foram processados segundo técnica de rotina de um laboratório de Anatomia Patológica, que consiste na passagem do tecido em diversas diluições de álcool, iniciando com álcool a 70% progredindo até o etanol absoluto (100%), duas passagens em xilol à temperatura ambiente seguida da imersão em dois banhos de parafina a 60° C, e finalmente inclusão e formação de blocos de parafina, que após resfriados foram seccionados utilizando micrótomo rotativo (Jung Histocult 820 – Leica), quando então cortes de 5µm (micrômetros) de espessura foram retirados de todos os blocos e corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (Prophet *et al.*, 1992; Michalany, 1998) (Anexo 1).

5.6. PREPARO DO MATERIAL PARA A TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

- De todos os fígados processados para microscopia óptica, foram retirados cortes de 5µm e levantados em lâminas Super- frost®/ Plus (A. Daigger & Company, EUA). Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar em estufa a 60° C e, posteriormente, guardadas à temperatura ambiente até a realização do teste.

- O líquido ascítico imune para o vírus Morumbi foi preparado, conforme descrito na página 50 desta dissertação.

- A padronização para aplicação do antissoro no tecido foi inicialmente desenvolvida no Laboratório de Anatomia Patológica do IEC, sendo o teste final de

padronização realizado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo executada pela pesquisadora Alda Wakamatsu, sob orientação do Prof. Venâncio A. F. Alves.

absoluto I. O teste deste anticorpo em fragmentos hepáticos para pesquisa de antígeno do vírus Morumbi, sem digestão enzimática, incubado a 4°C por 18h, mostrou reação intensa até a diluição de 1:4000 em tampão PBS, pH 7.4, que foi selecionada para pesquisa.

5.6.1. Processamento imuno-histoquímico

Após a retirada da parafina em xilol a 60° C e, em xilol à temperatura ambiente, os cortes foram hidratados em álcool nas seguintes diluições: álcool absoluto I, II, III, 95% e 80%, para em seguida serem lavados em água corrente e água destilada. Posteriormente, os cortes foram lavados em tampão fosfato-sódico (PBS) 0,01 M, pH 7,4, em três banhos de cinco minutos cada (Anexos 1 e 2). Após, incubação com soro normal de cabra diluído a 1:20 por 20 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário (antissoro específico para o vírus Morumbi), na diluição de 1:4.000, 18h, *overnight* a 4° C. Após os cortes foram lavados em PBS três vezes por cinco minutos. Foi aplicada solução de anticorpos secundários de cabra anti-imunoglobulinas de camundongo e cabra antiimunoglobulinas de coelho pré-diluídos, incluídos em polímero dextran contendo moléculas de fosfatase alcalina (Sistema Envision, Dako, EUA) que foi incubado por 30 minutos a 37°C, seguido da lavagem em PBS, três banhos por cinco minutos cada. A seguir, foram aplicadas duas gotas de substrato específico, *Fast Red*, por três minutos em câmara escura à temperatura ambiente (fosfato de naftol, *Fast Red*). Após lavagem em água corrente e água destilada, passaram por contracoloração em Hematoxilina de Mayer, por dois

minutos. Foram lavados em água corrente e, em seguida, em água amoniacal e novamente em água corrente. Foram desidratados em álcool a 50%, 80%, 95%, absoluto I, II e III. Após a desidratação adicionou-se o Crystal Mount (Fisher Scientific Co.) e deixou-se a 37° C até secar. A montagem foi feita com uma gota de Entellan (Merck) (Anexo 2).

5.6.2. Controles utilizados na pesquisa de antígenos

5.6.2.1. Controle Positivo:

Foi utilizado um corte de tecido hepático de animal inoculado por via IIP, sacrificado após 72h, que mostrou à microscopia óptica, intensa e extensa lesão e que foi previamente submetido ao teste de padronização para a técnica de imunohistoquímica.

5.6.2.2. Controles Negativos

- Cortes de fígado dos animais do grupo controle foram submetidos a todas as seqüências do protocolo na mesma série de reações usadas para os casos teste.

- Corte de fígado de animal infectado e sacrificado 48h pós-inoculação foi submetido ao mesmo protocolo e na mesma série de reações dos casos teste, substituindo a fase do anticorpo primário pelo uso do tampão fosfato (PBS).

5.7. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para o exame do fígado, foram levados em consideração os seguintes parâmetros.

Em áreas portais, estudaram-se as seguintes alterações: edema, dilatação de ramo venoso, lesão de ramo arterial, hiperplasia ductal, infiltrado inflamatório e colestase.

Na análise dos lóbulos consideraram-se os hepatócitos, vasos (veias hepáticas e sinusóides), células de Kupffer (hiperplasia) e reação inflamatória constituída de mononucleares e polimorfonucleares. Os hepatócitos foram estudados quanto à presença de tumefação, esteatose, corpúsculo acidófilo, regeneração e colestase. Os vasos foram analisados, observando-se presença de dilatação dos sinusóides e veias hepáticas.

Todas as alterações foram semiquantificadas numa escala que variou de 0 (zero) a +++ (três cruzeiros); onde o 0 (zero) significou ausência de lesão; + (uma cruz) lesão leve; ++ (duas cruzeiros) lesão moderada e +++ (três cruzeiros) lesão intensa.

Para análise dos parâmetros estudados, levou-se em conta as definições de Dias e Moraes (1972) e Araújo (1990), para os eventos das lesões observadas no fígado dos animais estudados. Assim considerou-se:

- Edema portal, o afastamento do tecido intercelular e da tríade própria dessa área.

- Infiltrado inflamatório, presença de resposta à agressão, traduzida pela presença de leucócitos polimorfonucleares, mais frequentemente os neutrófilos ou pelo acúmulo de mononucleares, como os linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

- Dilatação de vaso, aumento do calibre vascular.

- Lesão arteriolar, presença de alteração no endotélio de revestimento ou na parede do vaso.

- Hiperplasia ductal, proliferação das vias condutoras da bile.

- Colestase, depósito de pigmento biliar, no parênquima hepático e áreas portais.

- Tumefação, células com citoplasma pálido com núcleo central.

- Metamorfose gordurosa, presença de imagem negativa dos triglicerídeos nos hepatócitos, após o processamento dos tecidos. Quando da apresentação microvesicular observam-se pequenos vacúolos ao redor do núcleo do hepatócitos e quando macrovesicular, notam-se espaços claros no citoplasma, com deslocamento do núcleo para a periferia das células.

- Corpos acidófilos, presença de necrose de hepatócitos isolados que se tornam ovóides ou redondos, de citoplasma mais eosinófilico que o normal, com núcleo menor, retraído (picnótico) basofílico.

- Regeneração, células com mais de um núcleo ou em fase de mitose e hepatócitos em arranjos pseudo-acinares.

- O critério para mensurar a “avaliação geral sobre a intensidade da hepatite”, obedeceu o índice adotado para avaliar os critérios estudados, sendo que foram considerados os grupos de parâmetros como degeneração, necrose e inflamação, entre outros, por cada área examinada. Assim, alterações observadas de uma a dez áreas em cem campos examinados, convencionou-se em + (uma cruz), alterações presentes em uma a dez áreas em dez campos examinados, ++ (duas cruzes), acima de dez áreas em cada campo médio examinado +++ (três cruzes).

5.8. ANÁLISE DO TESTE IMUNO-HISTOQUÍMICO

Foi considerada a análise semiquantitativa utilizando-se a escala de 0 (zero) a +++ (três cruces), onde o 0 (zero) significou ausência de marcação para o antígeno específico; + (uma cruz) presença de coloração em raras células; ++ (duas cruces) reação moderada; e +++(três cruces), correspondendo a reação intensa em numerosas células. O antígeno do vírus Morumbi foi estudado em sua distribuição geral, segundo sua localização portal, periportal, mediozonal e centrolobular. Na distribuição específica do antígeno, considerou-se no lóbulo, o citoplasma de hepatócitos íntegros ou em necrose/apoptose, células de Kupffer na luz de sinusóides. Em áreas portais, estudaram-se veias, artérias, ductos biliares e interstício, e no interior de macrófagos.

6. RESULTADOS

Todos os achados histológicos e imuno-histoquímicos são apresentados individualmente nos anexos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e a análise por grupo encontra-se descrita no texto, nas tabelas e gráficos, usando a moda das alterações como representação de cada grupo.

6.1. ANÁLISE CLÍNICA

Os animais do grupo controle mostraram-se sempre ativos, sem nenhuma alteração evidente, durante o período do experimento.

No grupo dos inoculados, os animais apresentaram-se ativos às 24h, tornaram-se menos ativos no período de 48h, 72h e 96h de pós-inoculação nos grupos IC e IP e até às 120h nos animais do grupo SC. Tais achados são atribuíveis à encefalite, anteriormente estudados por Araújo *et al* 1996 e que não compõe o objetivo do presente estudo.

6.2. ANÁLISE MACROSCÓPICA DO FÍGADO

No grupo controle todos os fígados apresentaram-se pardacentos com superfícies brilhantes.

No grupo dos inoculados, nas primeiras 24h os fígados estavam pardacentos e brilhantes e com o avançar das horas, observou-se brilho diminuído e, ocasionalmente, consistência friável. Os fígados dos animais sacrificados às 96h apresentaram-se pardacentos, e brilhantes nos grupos inoculados por via IC e IP, o mesmo ocorrendo no grupo inoculado por via SC e sacrificado às 120h.

TABELA 6.3. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO

6.3.1. Alterações Portais

Em todos os animais do grupo controle, as áreas portais estão preservadas, não se observando alterações histológicas.

Nos animais do grupo IC, chama atenção edema portal leve às 24h pós-inoculação, que desagrega o tecido intercelular e as estruturas próprias dessas áreas. Edema leve persiste às 48h e em três animais das 72h pós-inoculação, já não sendo mais percebido nos três animais restantes deste horário, bem como nos animais das 96h pós-inoculação (Tabela 1).

No grupo IP, às 24h, a tríade portal aparece bem mais dissociada, devido à presença de edema moderado, notando-se variação para leve às 48h e percebendo-se o desaparecimento às 72h e 96h (Tabela 1).

No grupo SC, fica evidente às 24h a presença de edema leve, que mantém afastado o tecido intercelular. Observa-se variação de leve a moderado às 48h e ausência desta alteração às 72h, 96h e 120h (Tabela 1).

TABELA 1 - Frequência da intensidade do edema em área portal conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC						CONTROLE / IP						CONTROLE / SC							
Hora																					
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96						A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96						A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120							
0		2	2	2	3	2	3	2	2	2	3	2	3	2	2	2	5	2	6	2	5
1+		6	6	3				2	6	2				6	3	1					
2+								4		1				3							
3+																					
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de edema
1+ - Edema leve
2+ - Edema moderado
3+ - Edema intenso
FONTE: Dados Primários

Acompanhando o edema vê-se o infiltrado inflamatório que no grupo IC é leve às 24h, e está constituído predominantemente de mononucleares e raros polimorfonucleares, neutrófilos. Torna-se moderado às 48h, volta a ser leve às 72h. Encontra-se ausente às 96h pós-inoculação (Tabela 2).

No grupo IP o infiltrado inflamatório predomina na apresentação leve às 24h sendo dominantemente mononuclear com raros polimorfonucleares, neutrófilos mais evidente junto à vênula, aparece moderado às 48h, torna-se leve às 72h, persiste neste padrão até às 96h pós-inoculação (Tabela 2).

No grupo SC o infiltrado inflamatório surge leve às 24h, constituído basicamente de mononucleares de permeio com alguns leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos, evolui para moderado às 48h, torna-se leve em três animais das 72h e 96h, quando já é possível observar ausência desta alteração nos três outros animais destes mesmos horários, além daqueles animais das 120h (Tabela 2).

TABELA 2 - Frequência da intensidade do infiltrado inflamatório em área portal conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC						CONTROLE / IP						CONTROLE / SC							
Hora																					
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96						A ₅ 24 A ₆ 48 A ₇ 72 A ₈ 96						A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120							
0		2	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	5
1+		5	2	5				4	1	4	2	6	1	3	3						
2+		1	4					2	5	2	1	5									
3+																					
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de infiltrado
1+ - Infiltrado leve
2+ - Infiltrado moderado
3+ - Infiltrado intenso

FONTE: Dados primários

O ramo de veia porta aparece alterado nos animais do grupo IC com dilatação moderada do calibre do vaso que pode ser percebida às 24h, variando de moderada a intensa às 48h, e de leve a moderada às 72h, continuando com leve dilatação às 96h pós-inoculação, embora já esteja ausente em um animal desse horário (Tabela 3 e Figura 4).

Nos animais do grupo IP a dilatação de ramo de veia porta é leve às 24h, variando de leve a moderada às 48h. Esta alteração se mantém ainda moderada às 72h, passando a leve, às 96h (Tabela 3 e Figura 4).

Nos animais do grupo SC, dilatação leve do ramo de veia porta é vista às 24h, continuando leve em três animais, porém, torna-se moderada nos três animais restantes às 48h, sofre variação às 72h e 96h visto que se percebe ainda dilatação leve em três animais de cada um destes períodos e ausência de alteração nos seis animais restantes destes horários, assim como em todos os cinco animais das 120h (Tabela 3 e Figura 4).

Não se percebe durante os experimentos lesão arteriolar, hiperplasia ductal e colestase em ductos biliares em nenhum dos animais, dos três grupos estudados.

TABELA 3 - Frequência da intensidade da dilatação de ramos venosos portais conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC					CONTROLE / IP					CONTROLE / SC							
Hora																			
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96					A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96					A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120							
0		2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	3	2	5
1+					3	2	6	3	1	2		6	3	3	3				
2+		6	3	3			3	5				3							
3+			3																
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	3			2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de dilatação
1+ - Dilatação leve
2+ - Dilatação moderada
3+ - Dilatação intensa

FONTE: Dados primários

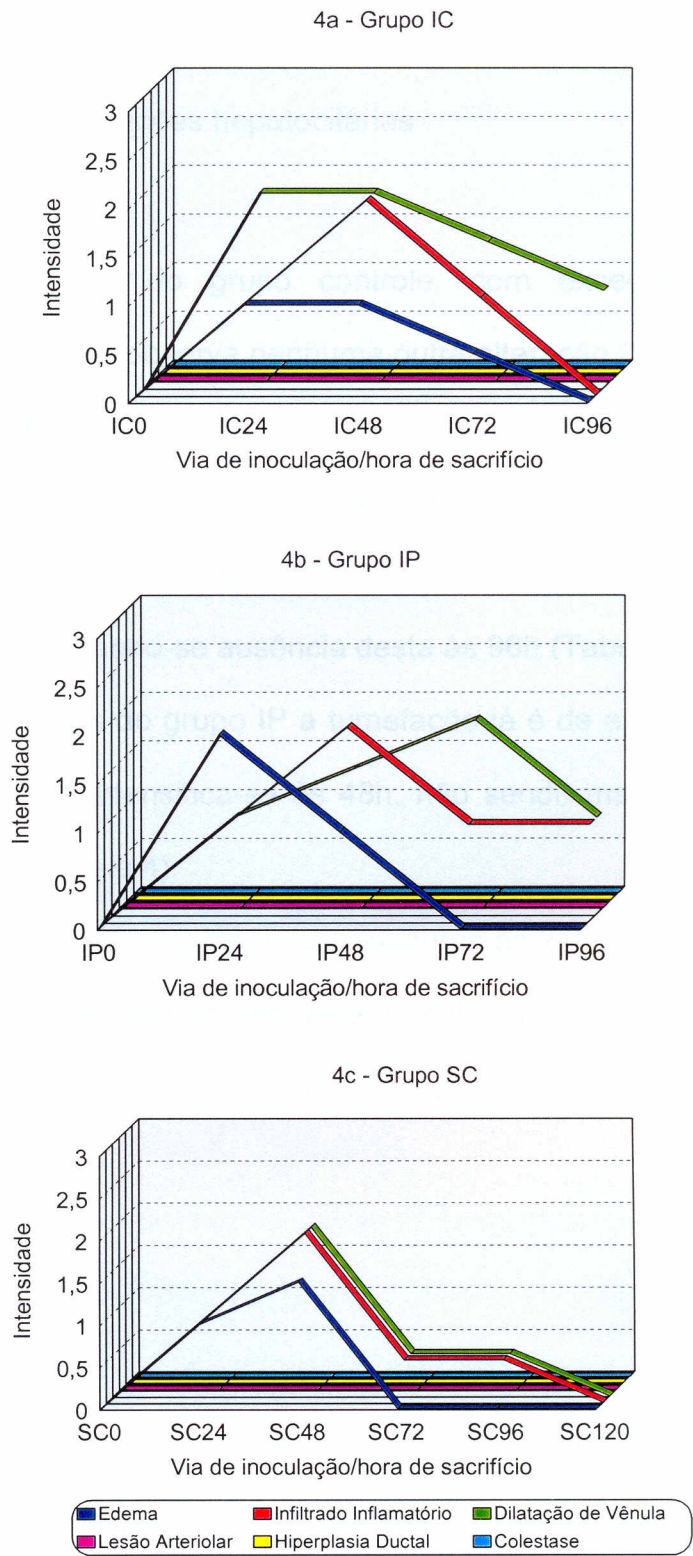


FIGURA 4 – Distribuição cronológica das modas das alterações portais de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.

TABELA 4 6. 3. 2. Alterações Lobulares

6.3.2. 1. Alterações hepatocitárias

Nos animais do grupo controle, com exceção da metamorfose gordurosa discreta, não se observa nenhuma outra alteração (Tabela 4 e Figura 5).

Fazendo parte do processo de resposta a agressão tecidual vê-se tumefação celular que no grupo IC é predominantemente moderada e difusa às 24h pós-inoculação. Às 48h tem apresentação variável de leve a intensa, apresentando-se moderada às 72h, notando-se ausência desta às 96h (Tabela 4).

Nos animais do grupo IP a tumefação já é de apresentação moderada às 24h pós-inoculação, intensifica-se às 48h, não sendo mais percebida às 72h e 96h pós-inoculação (Tabela 4).

No grupo SC, tumefação intensa surge às 24h pós-inoculação, torna-se predominantemente moderada às 48h, leve às 72h e já está ausente em quatro dos seis animais às 96h, permanecendo assim às 120h pós-inoculação (Tabela 4).

TABELA 4 - Frequência da intensidade da tumefação nos hepatócitos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS	CONTROLE / IC					CONTROLE / IP					CONTROLE / SC								
Hora																			
Morfologia	A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96					A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96					A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120								
0	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	4	2	5	
1+	2	3	2	1		2	2	2	1			2	4	2					
2+	4		4			4	1	1				2	3						
3+		3					3					4	1						
TOTAL	2	6	2	6	2	6	2	3		2	6	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência tumefação
1+ - Tumefação leve
2+ - Tumefação moderada
3+ - Tumefação intensa
FONTE: Dados primários

Surpreende-se metamorfose gordurosa macro ou microvesicular de apresentação leve em apenas um animal de cada um dos seguintes subgrupos controle, A₂, A₄, A₈, A₁₁ e A₁₂ e de apresentação moderada em um dos dois animais dos subgrupos controle, A₁, A₅ e A₉ (Tabela 5).

Metamorfose gordurosa micro e macrovesicular acompanham as demais alterações hepatocitárias no grupo dos animais infectados, sendo que no grupo IC aparece de apresentação leve às 24h, permanece nesse padrão às 48h, desaparece na maioria dos animais às 72h, embora que ainda esteja presente em dois animais desse horário, tem apresentação leve ainda nos animais de 96h pós-inoculação (Tabela 5 e Figura 6A).

No grupo IP, nos animais de 24h, a metamorfose gordurosa chama atenção, variando de leve a intensa, em contraste com os horários de 48h, 72h e 96h, quando já está ausente, na maioria dos animais (Tabela 5 e Figura 6B).

Nos animais do grupo SC a metamorfose gordurosa é percebida de forma leve às 24h pós-inoculação, embora se observe ausência desta lesão em três dos seis animais, predomina na forma leve às 48 horas e desaparece a partir das 72h pós-inoculação, ainda que seja observada em dois animais desse horário e em dois outros às 96h pós-inoculação (Tabela 5 e Figura 6C).

TABELA 5 - Frequência da intensidade da metamorfose gordurosa nos hepatócitos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC							CONTROLE / IP							CONTROLE / SC								
Hora																								
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96							A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96							A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120								
0		1	2	1	1	2	4	1	1	2	5	2	5	1	3	1	3	2	1	4	1	4	2	5
1+			4	1	4		2	1	3		2		1	1	1		2		5	1	2	1	2	
2+		1			1					1	1					1								
3+										3							1		1					
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	5

Legenda:
0 - Ausência de metamorfose gordurosa
1+ - Metamorfose gordurosa leve
2+ - Metamorfose gordurosa moderada
3+ - Metamorfose gordurosa intensa
FONTE: Dados primários

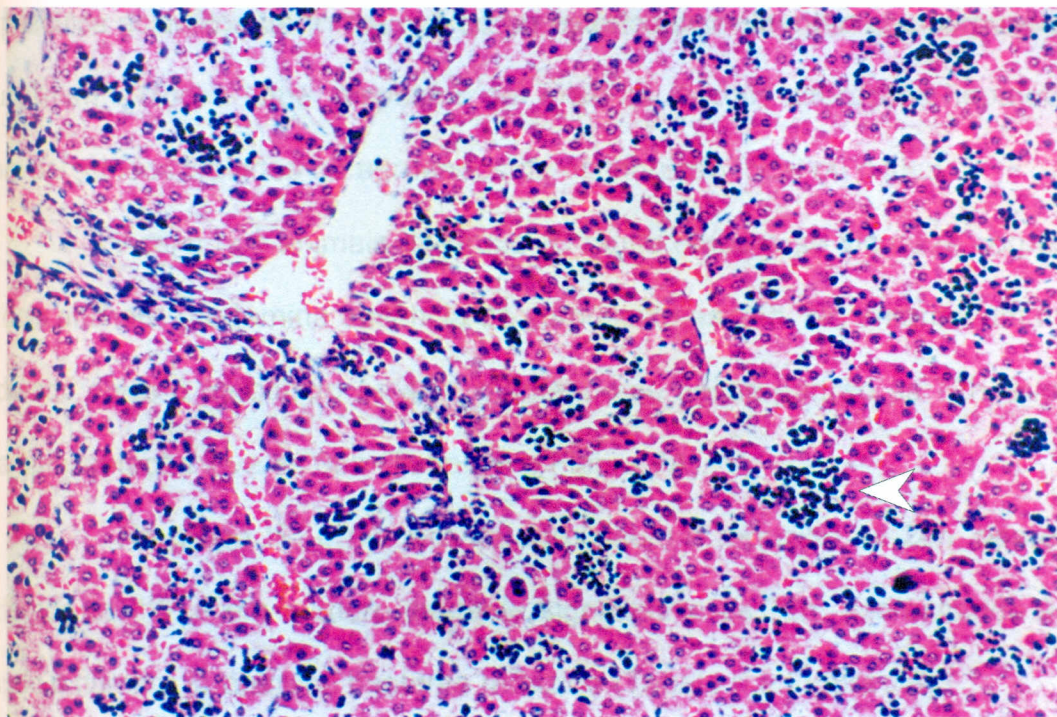


FIGURA 5. Corte de fígado de animal do grupo controle exibindo arquitetura habitual, estruturas preservadas, com número razoável de células hematopoiéticas (HE -x200).

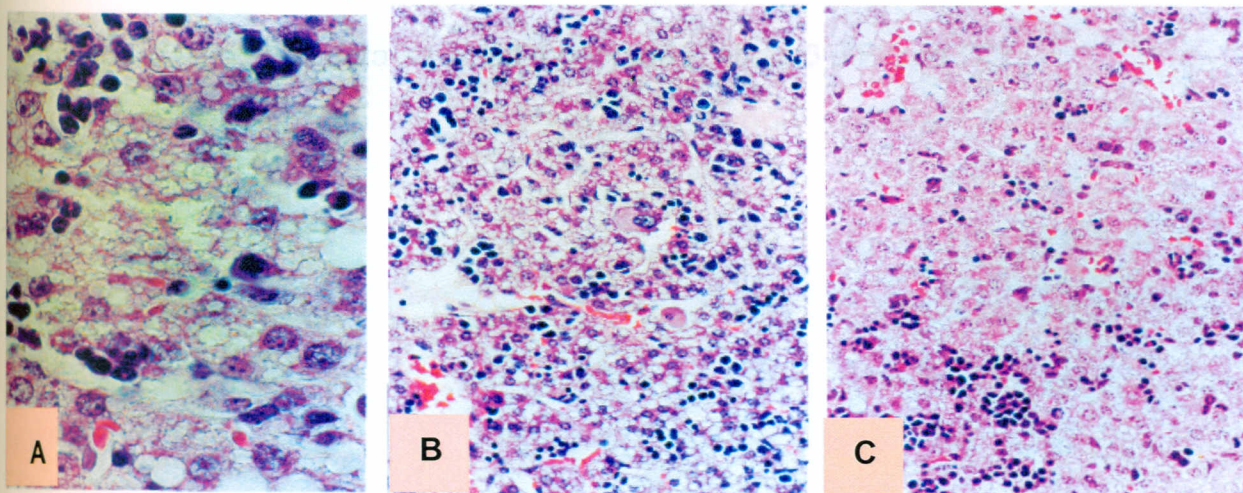


FIGURA 6. Seções de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando degeneração gordurosa, macro e microvesicular. **A)** Detalhe da alteração do subgrupo IC (HE - x1000); **B)** Subgrupo IP (HE - x400) **C)** Subgrupo SC (HE - x400).

Corpúsculos acidófilos de forma ovóide ou esférica semelhantes aos corpúsculos de Councilman – Rocha Lima, dispostos em meio as demais alterações hepatocitárias foram percebidos isolados ou agrupados de distribuição focal ou difusa.

Assim nos animais do grupo IC muito embora se visualize corpúsculos em dois animais, predomina ausência de corpúsculo às 24h. No entanto, um número moderado deles é percebido às 48h, mantendo-se nesse padrão às 72h, evoluindo para apresentação leve às 96h (Tabela 6 e Figura 7A).

No grupo IP, o número de corpúsculo é reduzido às 24h, aparecendo moderado às 48h e em número bastante significativo às 72h, decrescendo às 96h, quando o número já aparece bastante reduzido (Tabela 6 e Figura 7B).

Nos animais do grupo SC vários corpúsculos acidófilos isolados são visualizados às 24h, no entanto, surpreende-se aumento do número às 48h, para depois decrescer nos animais sacrificados às 72h e 96h, com variação acentuada às 120h, onde já é possível perceber ausência da lesão em alguns animais, sendo que em outros a lesão apresenta-se ainda moderada (Tabela 6 e Figura 7C).

TABELA 6 - Frequência da intensidade do aparecimento de corpúsculo acidófilo nos hepatócitos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC						CONTROLE / IP					CONTROLE / SC								
Hora																					
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96						A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96					A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120								
0		2	4	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
1+			2		1	1	2		5			3		4		2		4	4		1
2+					5	5				6	1				4		1				2
3+										5											
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de corpúsculo acidófilo
1+ Presença leve de corpúsculo acidófilo
2+ Presença moderada de corpúsculo acidófilo
3+ Presença intensa de corpúsculo acidófilo
FONTE: Dados primários

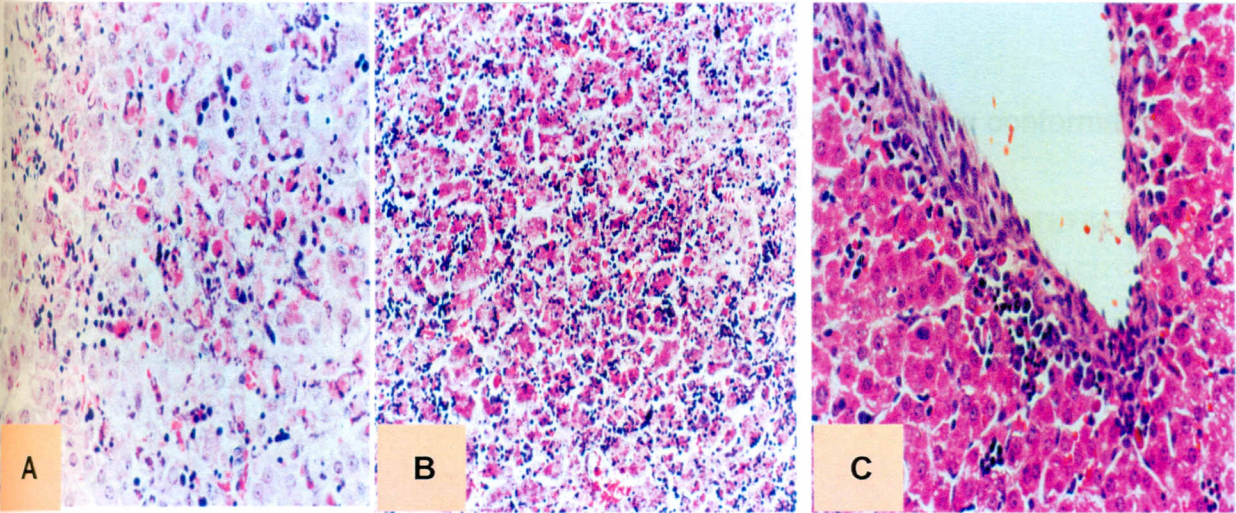


FIGURA 7. Corte de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando necrose e presença de corpúsculos acidófilos (Councilman - Rocha Lima). **A)** Subgrupo IC (HE - x200); **B)** Subgrupo IP (HE - x400); **C)** Subgrupo SC (HE - x400).

Nos animais do grupo IC, às 24h e 48h predomina ausência de regeneração entre os animais, às 72h aparece em grau leve, sendo bastante significativa às 96h (Tabela 7, Figura 8).

No grupo IP, às 24h destaca-se ausência da regeneração na maioria dos animais, porém, às 48h é de apresentação leve, varia de leve a intensa às 72h, tornar-se bastante evidente às 96h pós-inoculação (Tabela 7, Figura 8).

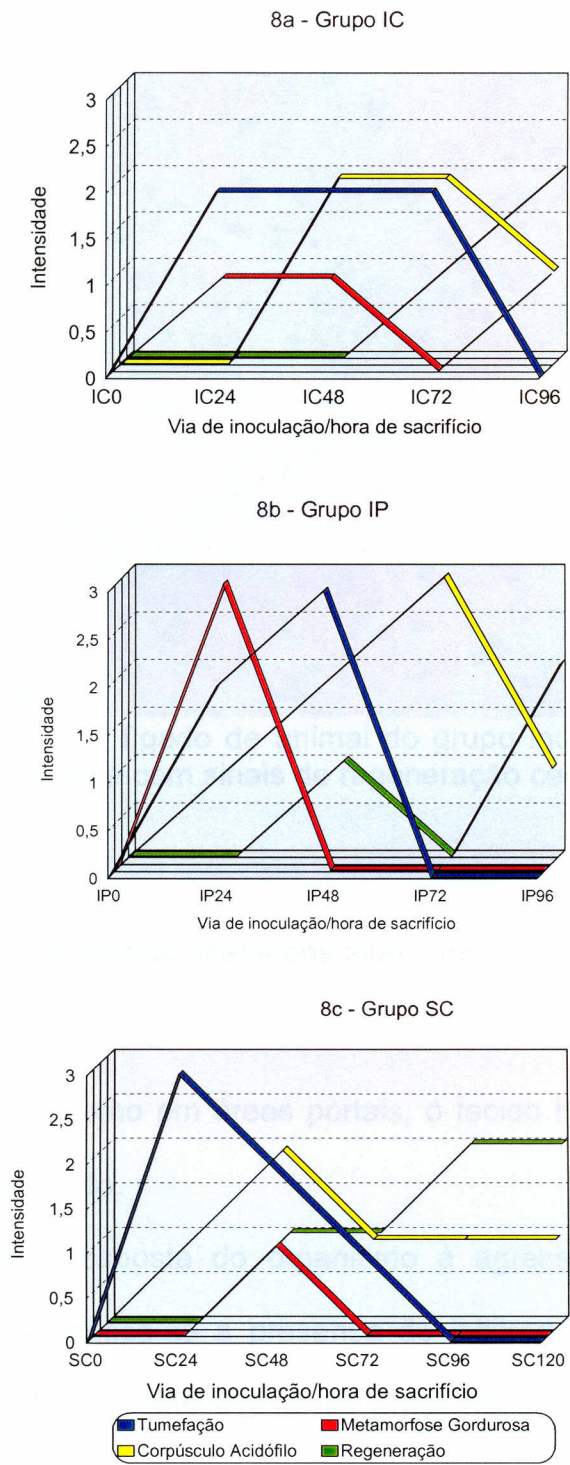
No grupo SC, ausência de regeneração prevalece às 24h, aparecendo em grau menor às 48h, permanecendo nesta apresentação às 72h, elevando-se para moderada às 96h e às 120h (Tabela 7, Figuras 8 e 9).

TABELA 7 - Frequência da intensidade da regeneração hepática conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC						CONTROLE / IP						CONTROLE / SC									
Hora																							
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96						A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96						A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120									
0		2	4	2	6	2	2	2	4	2	2	2	3	2	2	5	2	2	2	1	2	2	
1+			2		6				2		4		2	1		1		3		4			
2+							3						1	2				1		1	4	3	
3+																				2		2	
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Regeneração ausente
1+ Regeneração leve
2+ Regeneração moderada
3+ Regeneração intensa

FONTE: Dados primários



Fonte: Dados Primários

FIGURA 8 – Distribuição cronológica das modas das alterações hepatocitárias de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.

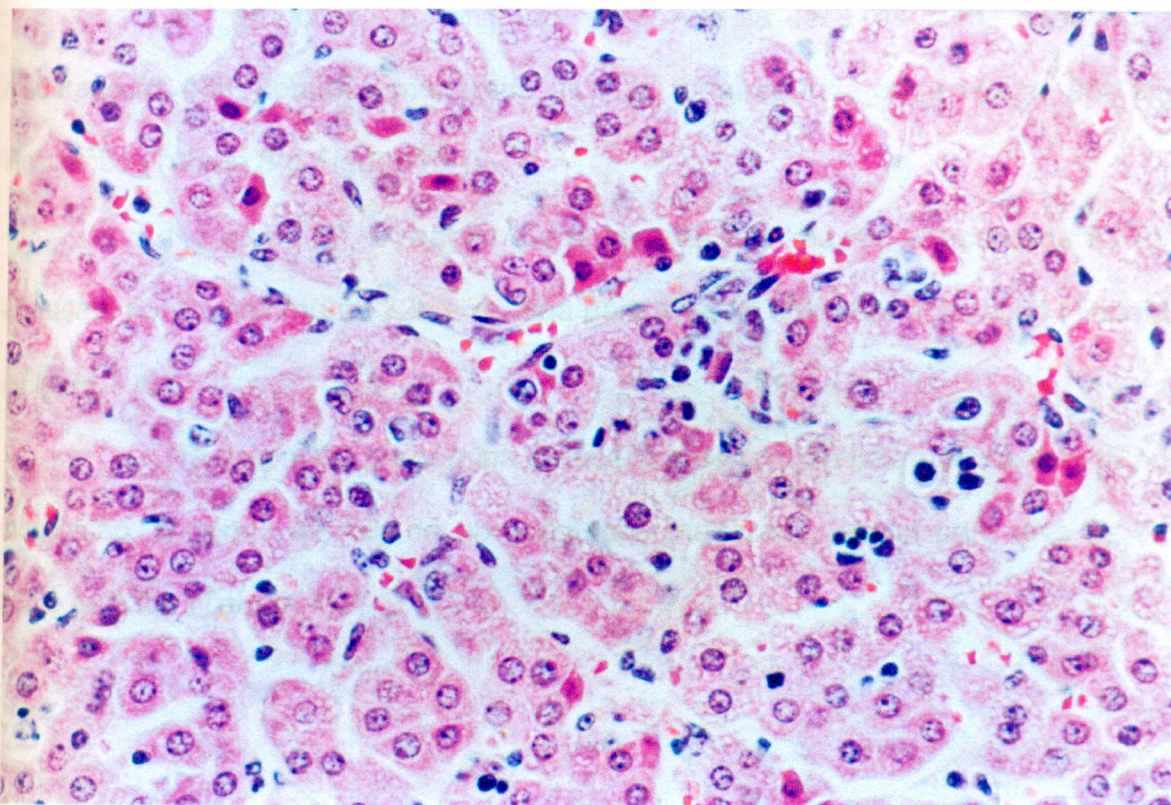


FIGURA 9. Seção de fígado de animal do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando parênquima com sinais de regeneração celular (HE - x400).

6.3.2.2. Outras alterações lobulares

Assim como em áreas portais, o tecido hepático nos animais controle encontra-se preservado.

Como resposta do organismo à agressão celular dos lóbulos, nos grupos infectados verifica-se a presença de infiltrado inflamatório. Esta reação a princípio pode estar ausente e quando presente encontra-se às proximidades de focos necróticos, constituída de mononucleares de permeio com alguns leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos, que são vistos até às 72h pós-inoculação.

No grupo IC, o infiltrado apresenta-se leve às 24h, passando a moderado às 48h, continua moderado às 72h, torna-se leve outra vez às 96h pós-inoculação (Tabela 8 e Figura 10A).

No grupo IP, a reação surge leve às 24h, passa a moderada às 48h, alcança o ponto máximo às 72h e declina para leve às 96h pós-inoculação (Tabela 8 e Figura 10B).

No grupo SC predomina a ausência de reação inflamatória às 24h pós-inoculação, surgindo às 48h de apresentação moderada, evolui para leve às 72h, 96h e às 120h (Tabela 8).

TABELA 8 - Frequência da intensidade do infiltrado inflamatório nos lóbulos conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS	CONTROLE / IC						CONTROLE / IP				CONTROLE / SC							
Hora																		
Morfologia	A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96						A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96				A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120							
0	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	5	2	2	1	2	2	2
1+		5			2	2	6			3	1	1		4		4		3
2+				6	4			6	1			5		1				
3+									5									
TOTAL	2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	3	2	5

Legenda:
0 - Ausência de infiltrado inflamatório
1+ Infiltrado inflamatório leve
2+ Infiltrado inflamatório moderado
3+ Infiltrado inflamatório intenso
FONTE: Dados primários

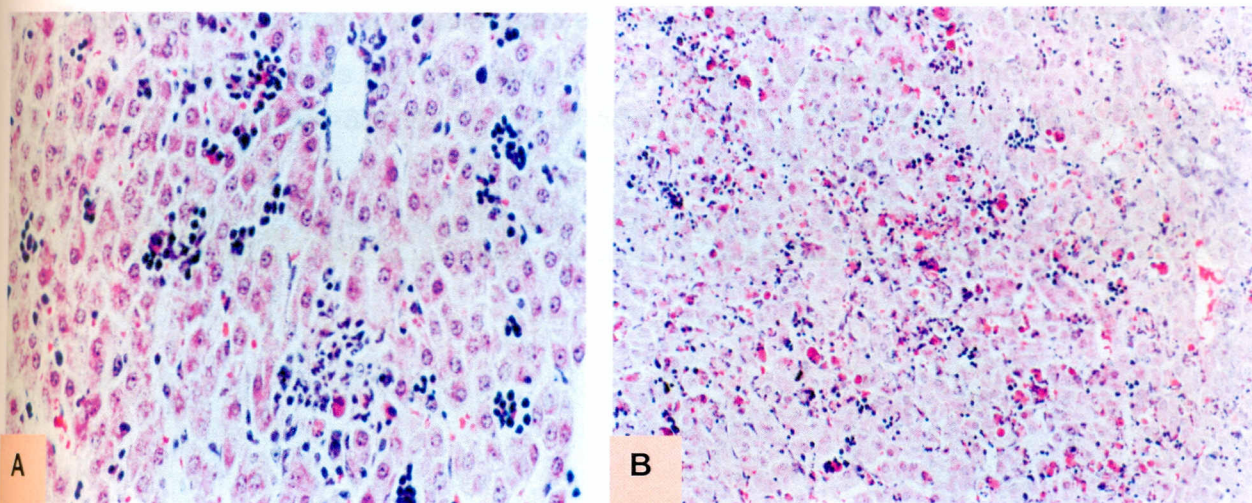


FIGURA 10. Corte de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi mostrando reação inflamatória no parênquima. **A)** Subgrupo IC (HE -x400); **B)** Subgrupo IP (HE - x200).

Dilatação de vênula hepática é vista em todos os três grupos estudados (Tabela 9).

No grupo IC, é inicialmente leve às 24h, passando a moderada às 48h, variando de leve a intensa às 72h, estando ausente em dois dos três animais das 96h (Tabela 9).

No grupo IP, às 24h já se percebe aumento leve do calibre de vênula hepática, passando a moderada às 48h, mantém-se neste padrão às 72h, não se observando mais em dois dos três animais às 96h (Tabela 9).

No grupo SC, a dilatação de vênula hepática surge às 24h de forma discreta, evolui para moderada às 48h, torna-se leve em alguns animais às 72h, varia de leve até desaparecer às 96h, sendo que às 120h há predomínio da dilatação leve (Tabela 9).

TABELA 9 - Frequência da dilatação de vênula hepática terminal (centrolobular) conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS	CONTROLE / IC						CONTROLE / IP						CONTROLE / SC							
Hora																				
Morfologia	A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96						A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96						A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72 A ₁₂ 96, A ₁₃ 120							
0	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	2	
1+		5	2	2	1		5	2	1	1		6	2	4	3	3				
2+			4	2				4	5				4	1						
3+				2																
TOTAL	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de dilatação de vênula hepática
1+ Dilatação leve de vênula hepática
2+ Dilatação moderada de vênula hepática
3+ Dilatação intensa de vênula hepática

FONTE: Dados primários

Na evolução dos eventos patológicos do processo, observam-se ainda, dilatação e congestão dos sinusóides.

No grupo IC, às 24h há predomínio da ausência de dilatação, embora já se possa visualizar dilatação leve dos sinusóides em dois animais desse subgrupo. Dilatação leve é vista ainda às 48h, varia de leve a moderada às 72h, voltando a ser leve às 96h (Tabela 10).

No grupo IP, a dilatação dos sinusóides ainda não se faz presente às 24h, só ocorrendo às 48h, de forma leve, é de apresentação moderada às 72h embora seja intensa em dois animais, desse horário, torna-se leve ou até desaparece às 96h (Tabela 10).

No grupo SC, verifica-se ausência de dilatação dos sinusóides às 24h, no entanto, surpreende-se às 48h, variando entre leve a moderada, persiste no padrão leve às 72h e 96h, variando a apresentação de moderada até ausência da alteração às 120h (Tabela 10).

TABELA 10 - Freqüência da intensidade da dilatação dos sinusóides conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC								CONTROLE / IP								CONTROLE / SC									
Hora																											
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96								A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96								A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120									
0		2	4	2	2	2		2	1	2	6	2		2	2	1	2	6	2		2	1	2	2	2	2	
1+			2		3		3		2			5			2				3		3		4			1	
2+					1		3					1		4					3		2					2	
3+													2														
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2		6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	6	5

Legenda:
0 - Ausência de dilatação dos sinusóides
1+ Dilatação leve dos sinusóides
2+ Dilatação moderada dos sinusóides
3+ Dilatação intensa dos sinusóides
FONTE: Dados primários

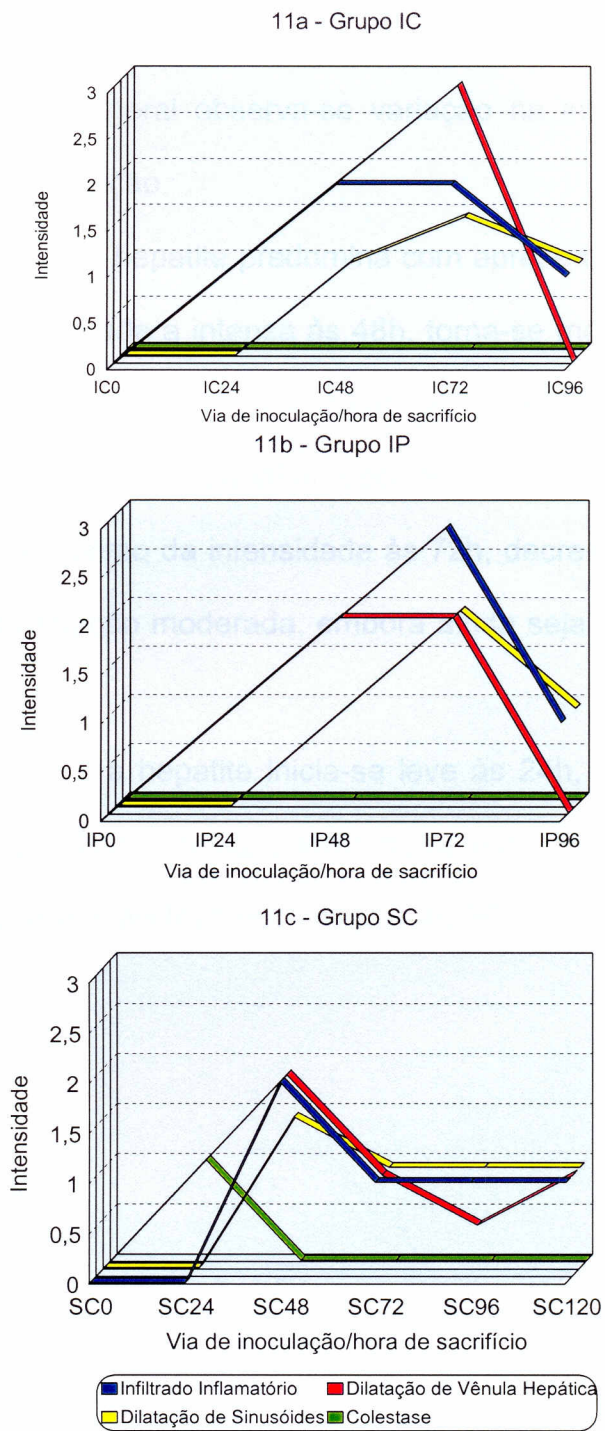
Colestase lobular leve chama atenção às 24h pós-inoculação apenas, nos animais do grupo SC, sendo discreta em um animal às 48, 72 e 96h da via IC. Está ausente na via IP. (Tabela 11 e Figura 11).

A hiperplasia das células de Kupffer está presente no fígado dos diversos animais dos três grupos em estudo (Anexos 3, 4 e 5).

TABELA 11 - Frequência da intensidade da colestase conforme os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC								CONTROLE / IP								CONTROLE / SC									
Hora																											
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96								A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96								A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120									
0		2	6	2	5	2	5	2	2	2	6	2	6	2	6	2	3	2	2	2	6	2	6	2	6	2	5
1+					1		1		1										4								
2+																											
3+																											
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de colestase
1+ Colestase leve
2+ Colestase moderada
3+ Colestase intensa
FONTE: Dados primários



Fontes: Dados Primários

FIGURA 11 – Distribuição cronológica das modas de outras alterações lobulares de acordo com as vias e horas de sacrifício.

6.3.3. Avaliação Geral Sobre a Intensidade da Hepatite

De um modo geral observa-se variação na intensidade da hepatite, com relação à via de inoculação.

No grupo IC, a hepatite predomina com apresentação leve às 24h pós-inoculação. Varia de moderada a intensa às 48h, torna-se moderada e leve às 72h, ficando exclusivamente leve às 96h pós-inoculação (Tabela 12 e Figura 12).

No grupo IP, a lesão global aparece leve às 24h, evolui para moderada às 48h, atinge o ponto máximo da intensidade às 72h, decrescendo às 96h, porém, predominando a apresentação moderada, embora ainda seja intensa em um animal (Tabela 12 e Figura 12).

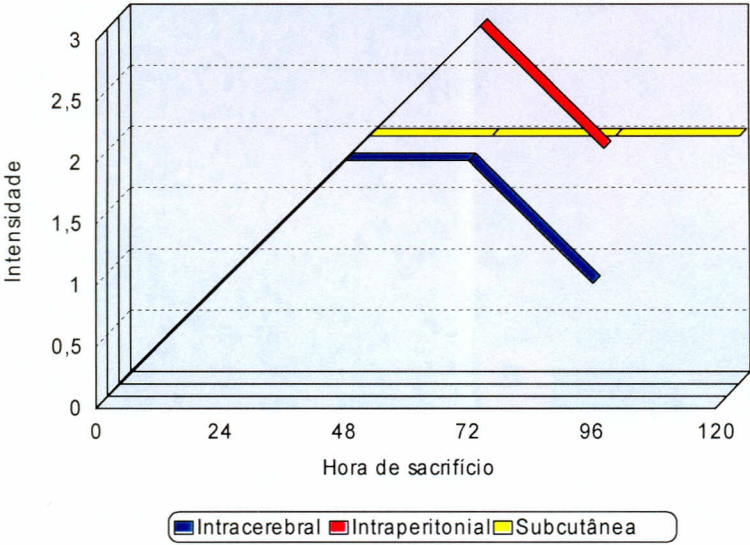
No grupo SC, a hepatite inicia-se leve às 24h, passa a moderada às 48h, predominando e persistindo neste padrão de apresentação às 72h, 96h e 120h, ainda que se observem reação leve em animais às 96 e 120h (Tabela 12 e Figura 12).

TABELA 12 - Frequência da intensidade da hepatite experimental de acordo com os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS		CONTROLE / IC				CONTROLE / IP				CONTROLE / SC					
Hora															
Morfologia		A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96				A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96				A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120					
0		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
1+		4		2	3	6				6			2	1	
2+		2	5	4			6	2	2		6	6	4	4	
3+			1					4	1						
TOTAL		2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de hepatite
1+ - Hepatite leve
2+ - Hepatite moderada
3+ - Hepatite intensa

FONTE: Dados primários



Fonte: Dados Primários

FIGURA 12 – Distribuição cronológica das modas de frequência da intensidade da hepatite pelo vírus Morumbi de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.

6.3.4. Distribuição do Antígeno

A imunorreação específica não foi observada no fígado de nenhum dos animais inoculados, considerados controle negativo para reação imuno-histoquímica (Figura 13A). No entanto, ocorreu reação inespecífica em áreas portais e nos lóbulos, mais intensa na luz de ramos venosos e discreta no citoplasma das células hematopoiéticas. Tal reação não dificultou significativamente a identificação da resposta positiva específica.

Nos animais inoculados, a imunorreação específica foi observada exclusivamente nos lóbulos, na coloração vermelha, de aspecto granuloso, sempre detectada em grandes quantidades no interior da célula, preenchendo totalmente ou parcialmente o citoplasma (Figura 13B).

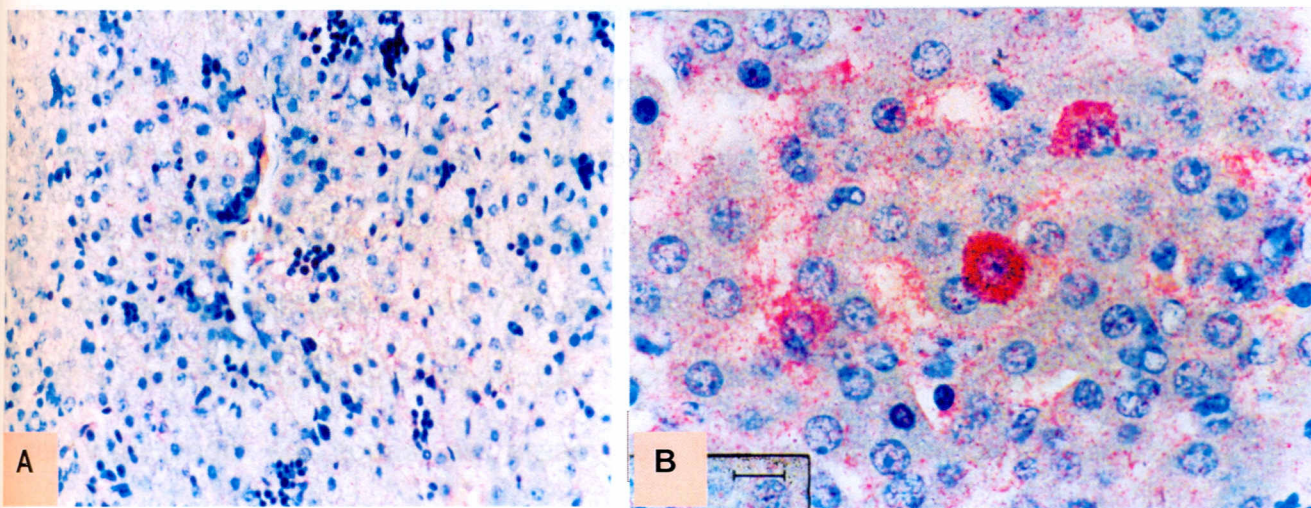


FIGURA 13. Cortes de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi, submetidos ao teste imuno-histoquímico. **A)** Controle negativo (IHQ - x400). **B)** Reação positiva no hepatócito de padrão granular (IHQ - x1000).

No grupo IC às 24h pós-inoculação, já se constatava a presença de pequena quantidade de antígeno, exclusivamente no citoplasma de hepatócitos

íntegros, da zona central do lóbulo, porém, bem mais evidente na zona mediolobular. Às 48h, a apresentação do antígeno tornou-se moderada, tanto no citoplasma de hepatócitos íntegros, como no citoplasma de células necrosadas, sendo ainda, leve no citoplasma da célula de Kupffer, da porção média e central dos lóbulos. Às 72h pós-inoculação, a presença de antígeno continuou moderada nos hepatócitos íntegros e naqueles necrosados, chamando atenção, no entanto, para as células de Kupffer, em quantidade moderada, de distribuição difusa nos lóbulos, sendo bem mais visualizado nas zonas mediolobular e centrolobular. Às 96h ocorreu decréscimo da quantidade de células contendo antígeno, ficando restrita ainda que de forma leve, aos hepatócitos necrosados e as células de Kupffer, da porção média dos lóbulos (Tabela 13 e Figuras 14 e 15A, B e C).

No grupo IP, às 24h pós-inoculação chamou atenção à total ausência de antígeno, no tecido hepático, nos seis animais examinados. Às 48h pós-inoculação a presença do antígeno, variou de leve a moderada, no citoplasma de hepatócitos íntegros, porém já em moderada quantidade nos hepatócitos necrosados, encontrando-se ainda de forma leve no citoplasma das células de Kupffer, bem pouco visualizados na região periportal e centrolobular, e bem mais apreciável na mediolobular. Às 72h pós-inoculação, a presença do antígeno era intensa, especialmente nos hepatócitos necrosados e células de Kupffer, podendo ser visualizado em todas as áreas dos lóbulos, predominando nas zonas mediolobular e centrolobular. Às 96h a presença do antígeno, torna-se leve nos hepatócitos íntegros, mas, ainda se manteve moderada, nos hepatócitos necrosados e nas células de Kupffer, em todas as áreas dos lóbulos, concentrando-se mais, na porção mediolobular (Tabela 13 e Figuras 14 e 16A).

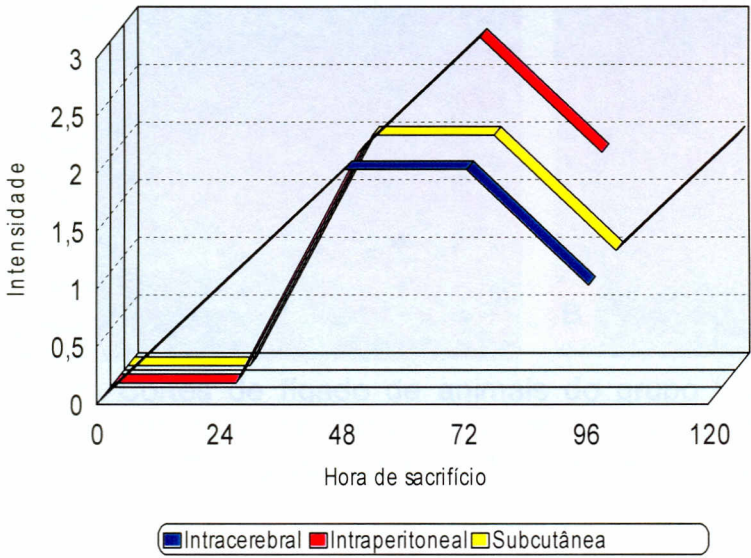
No grupo SC também não se percebeu a presença de antígeno às 24h pós-inoculação, só ocorrendo às 48h pós-inoculação, e variou de leve a moderada, nos hepatócitos íntegros, predominando apresentação leve nos hepatócitos necrosados já havendo inclusive envolvimento leve das células de Kupffer (Figura 16B) mais evidente na porção intermediolobular. Às 72h pós-inoculação já era leve a presença de antígeno nos hepatócitos íntegros. No entanto, apresentou-se moderada nos hepatócitos necrosados e no citoplasma das células de Kupffer, especialmente nas áreas periportais e mediolobulares. Às 96h predominou a ausência de antígeno nos hepatócitos íntegros. Já estava bastante reduzida a quantidade de antígeno nos hepatócitos necrosados e células de Kupffer, das regiões mediozonal e centrolobulares, contrastando com os achados das 120h quando houve predomínio da apresentação moderada do antígeno viral, nos hepatócitos necrosados e nas células de Kupffer, especialmente na porção média do lóbulo e discretamente em áreas centrolobular e periportal (Tabela 13 e Figuras 14, 17 e 18).

TABELA 13 – Distribuição do antígeno do vírus Morumbi no fígado de camundongos Swiss com hepatite de acordo com os grupos, vias de inoculação e horas de sacrifício.

GRUPOS	CONTROLE / IC				CONTROLE / IP				CONTROLE / SC							
Hora																
Quantidade	A ₁ 24, A ₂ 48, A ₃ 72, A ₄ 96				A ₅ 24, A ₆ 48, A ₇ 72, A ₈ 96				A ₉ 24, A ₁₀ 48, A ₁₁ 72, A ₁₂ 96, A ₁₃ 120							
0	2	2	2	2	2	6	2	2	2	6	2	2	1	2	1	2
1+	6		1	2				1		2			5		2	
2+		6	5	1		6	2	2		4		5				3
3+							4									
TOTAL	2	6	2	6	2	6	2	3	2	6	2	6	2	6	2	5

Legenda:
0 - Ausência de imunorreatividade
1+ - Imunorreatividade leve
2+ - Imunorreatividade moderada
3+ - Imunorreatividade intensa

FONTE: Dados primários



Fonte: Dados Primários

FIGURA 14 – Distribuição cronológica das modas da intensidade do antígeno do vírus Morumbi de acordo com as vias e horas de sacrifício.

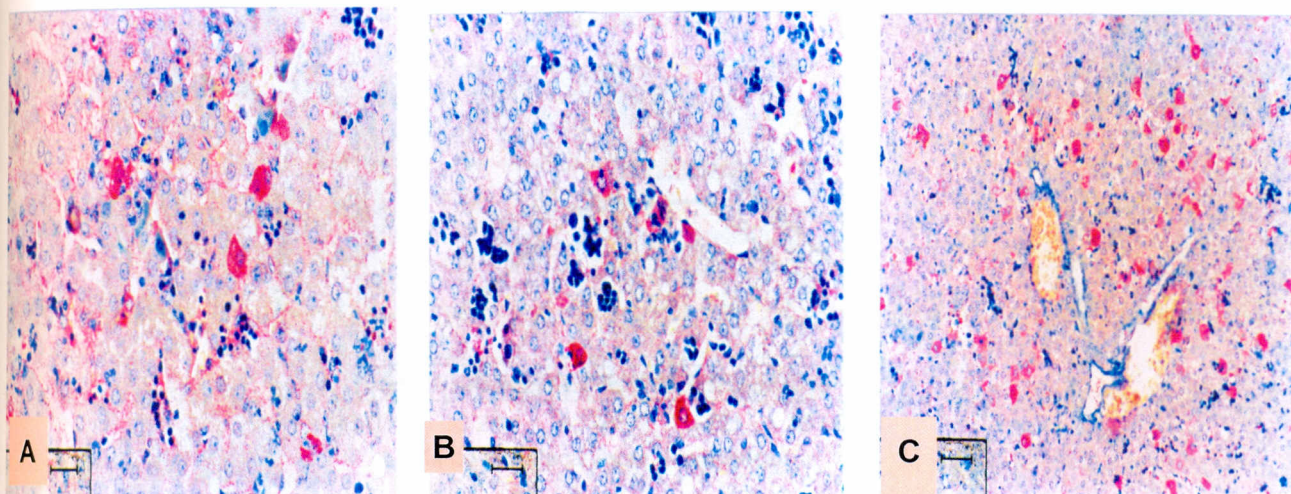


FIGURA 15. Cortes de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi, subgrupo IC, mostrando imunorreação nos hepatócitos e células de Kupffer. **A)** 24h (IHQ - x200); **B)** 48h (IHQ - x400); **C)** 72h. (IHQ - x400).

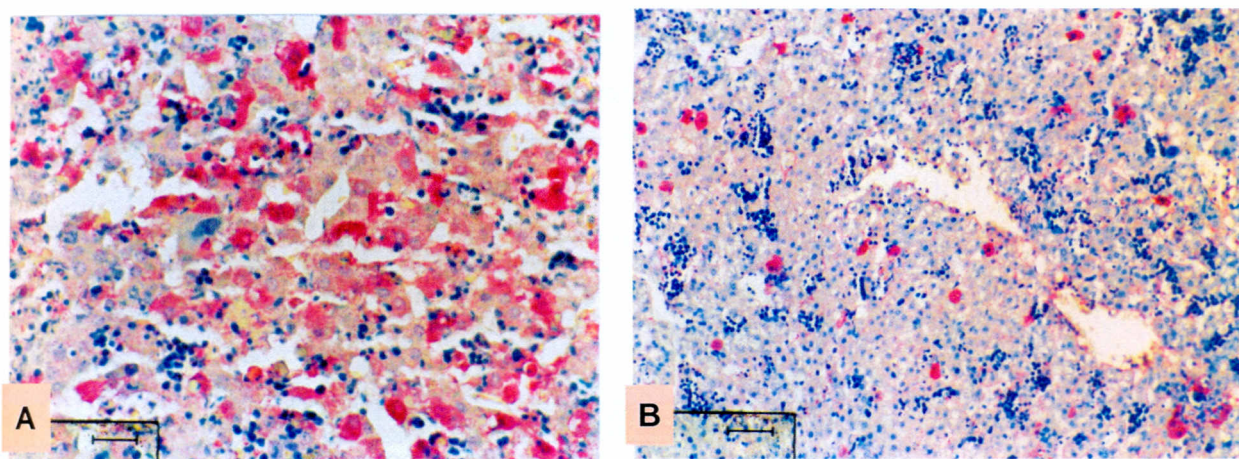
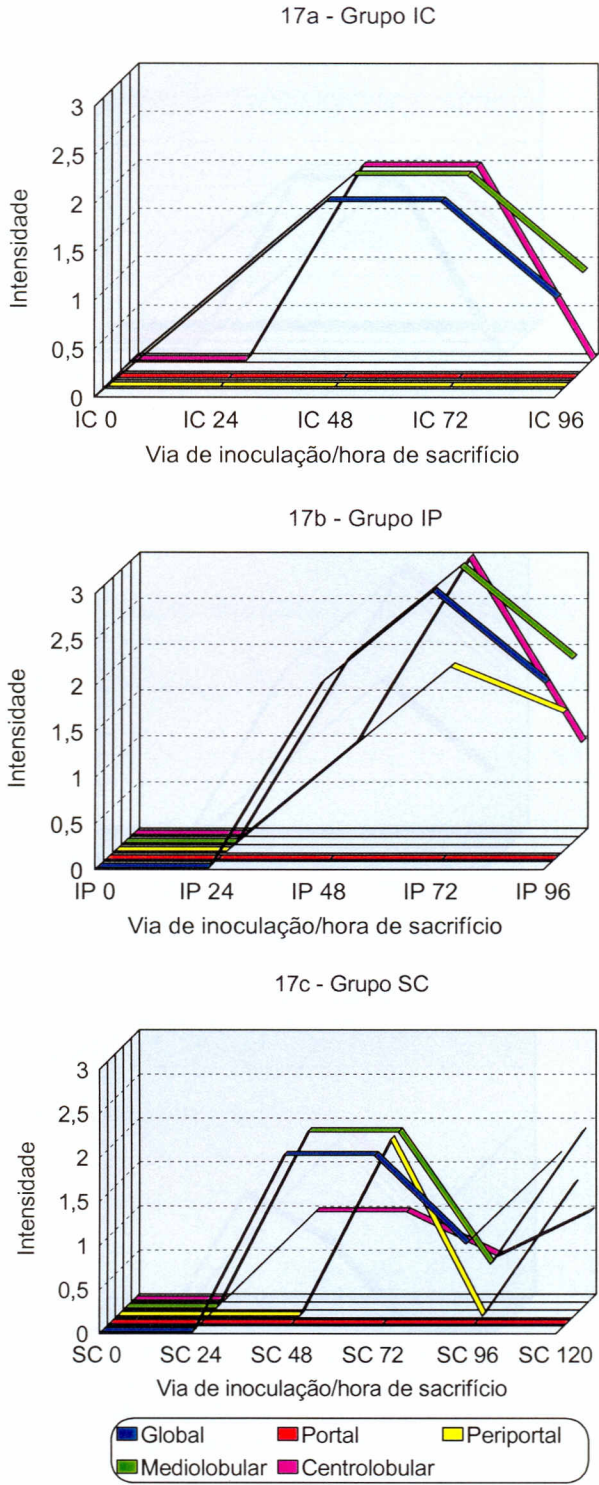
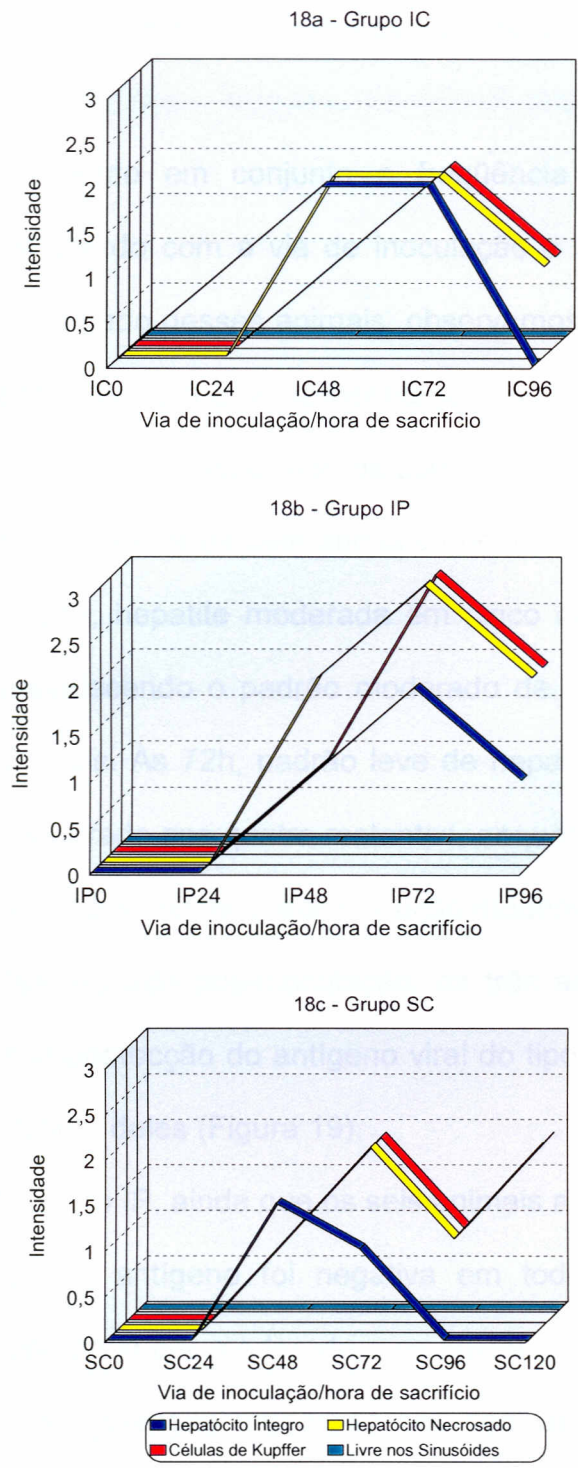


FIGURA 16. Cortes de fígado de animais do grupo inoculado com vírus Morumbi, exibindo imunorreação no citoplasma celular. **A)** Subgrupo IP 72h, com reação intensa. (IHQ - x200); **B)** Subgrupo SC 48h, com reação moderada (IHQ - x200).



Fonte: Dados Primários

FIGURA 17 – Distribuição geral do antígeno na infecção pelo vírus Morumbi conforme as vias de inoculação e horas de sacrifício.



Fonte: Dados Primários

FIGURA 18 – Distribuição cronológica das modas da incidência do antígeno do vírus Morumbi nos lóbulos de acordo com as vias de inoculação e horas de sacrifício.

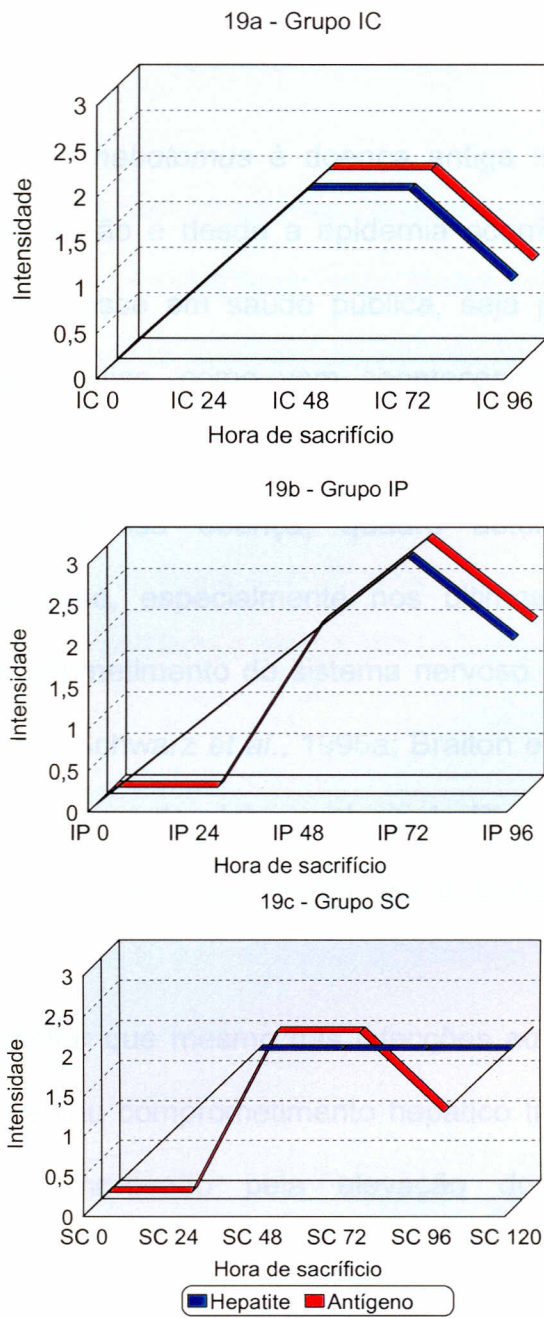
6.3.5. Interrelações entre as variáveis

Analisando em conjunto a frequência da intensidade da hepatite experimental, de acordo com a via de inoculação e a distribuição de antígeno do vírus Morumbi, no fígado desses animais, observamos que no grupo IC às 24h pós-inoculação, a lesão hepática é de apresentação leve em quatro animais e moderada nos dois restantes, quando relacionamos com a imunorreação verificamos presença leve de antígeno em todos os seis animais nesta ocasião. Às 48h pós-inoculação, ficou bastante nítida, hepatite moderada em cinco dos seis animais e intensa no sexto animal, prevalecendo o padrão moderado de apresentação do antígeno em todos os seis animais. Às 72h, padrão leve de hepatite foi observado em dois dos seis animais e moderado nos quatro restantes, enquanto o antígeno mostrou reação leve em apenas um dos seis animais, e reação moderada para o antígeno, nos cinco animais restantes. Às 96h pós-inoculação, os três animais apresentaram hepatite leve, sendo a inumodeteção do antígeno viral do tipo leve em dois desses animais e moderada no último deles (Figura 19).

No grupo IP, ainda que os seis animais apresentassem hepatite leve às 24h, a pesquisa de antígeno foi negativa em todos os animais. Às 48h pós-inoculação, a hepatite já era moderada, nos animais desse horário, coincidindo com a detecção da imunorreação moderada nos seis animais. Às 72h, dois dos seis animais apresentaram padrão moderado tanto para hepatite como para a imunorreação para o antígeno viral, o mesmo ocorrendo com os quatro outros animais restantes, que apresentaram lesão intensa e expressão máxima do antígeno para o vírus. Às 96h a hepatite é intensa em um dos três animais deste horário e

moderada nos outros dois, a pesquisa de antígeno é leve, em um deles, enquanto que persiste moderada nos outros dois animais (Figura 19).

Na análise do grupo SC, às 24h pós-inoculação observou-se ocorrência de hepatite leve nos seis animais estudados, que não exibiram antígeno viral detectável. Às 48h, os seis animais exibiram hepatite moderada, entretanto ocorreu presença leve de antígeno no fígado de dois animais deste horário e moderada, no fígado, dos quatro outros animais. Às 72h pós-inoculação, quando a hepatite ainda era moderada em todos os seis animais, viu-se a presença moderada de antígeno em cinco deles e total ausência no sexto. Às 96h pós-inoculação, encontrou-se hepatite leve em dois animais e ainda, moderada em quatro outros, que não correspondeu à pesquisa do antígeno, já ausente em um dos animais, sendo bastante leve nos cinco animais restantes. Às 120h pós-inoculação a hepatite mostrou-se leve em um dos animais e moderada nos quatro restantes, sendo a presença de antígeno leve em apenas dois animais e moderada nos três restantes (Figura 19).



Fonte: Dados Primários

FIGURA 19 – Comparação entre atividade histopatológica geral e a reação imuno-histoquímica para antígeno viral conforme as vias de inoculação e horas de sacrifício.

7. DISCUSSÃO

A febre do *Phlebotomus* é doença antiga no Velho Mundo, referida desde a guerra de Napoleão e desde a epidemia ocorrida na II Guerra Mundial. Ainda hoje desperta interesse em saúde pública, seja pela ocorrência de casos esporádicos ou de epidemias, como vem acontecendo na África (Peters, 1997; Thonnon *et al.*, 1999).

Predomina, nessa doença, quadro autolimitado (Sanford, 1994; Gordon, 1997), notando-se, especialmente nos últimos anos relatos de casos complicados, com comprometimento do sistema nervoso central pelos vírus TOS e RVF (Ehrnst *et al.*, 1985; Schwarz *et al.*, 1995a; Braiton *et al.*, 1998), bem como do comprometimento do fígado e do globo ocular pelo RVF (Van Velden *et al.*, 1977; Laughlin *et al.*, 1979; Thonnon *et al.*, 1999), daí o crescente interesse no estudo desses arbovírus.

Vale ressaltar que mesmo nas infecções autolimitadas como ocorrem com o SFS, já se observou comprometimento hepático transitório, durante o curso agudo da doença, comprovado pela elevação dos índices de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), no soro dos doentes, observados por Eitrem *et al.*, (1991a).

Na Região Amazônica, onde já é elevado o número de *Phlebovirus* isolados e caracterizados, sorologicamente, estão comprovados que dos 21 *Phlebovirus* identificados quatro são patogênicos para o homem, sabendo-se ainda muito pouco sobre esses arbovírus, que se distribuem de forma silenciosa por essa região, onde há ocorrências de óbitos por febre hemorrágica, muitos deles causados pelo vírus da febre amarela, porém outros ainda não elucidados.

O *Phlebovirus* Morumbi é um dos quatro arbovírus patogênicos para o homem, sendo o último deles identificado na Amazônia considerado novo para o mundo.

A utilização da microscopia óptica e da técnica de imuno-histoquímica favoreceu visualizar que na inoculação do vírus Morumbi tanto por via IC como por vias IP e SC há disseminação viral no organismo do camundongo seguida de hepatite aguda e que por meio da imuno-histoquímica é possível demonstrar no tecido lesado a presença do antígeno do vírus Morumbi.

7.1. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO

O delineamento do presente estudo permitiu a seguinte análise seqüencial das lesões:

Em áreas portais, percebeu-se a princípio edema que teve início a partir das 24h pós-inoculação nos três grupos infectados.

No grupo IC o edema iniciou leve, manteve-se nesse padrão até desaparecer em alguns animais no subgrupo IC 72.

No grupo IP diferentemente do grupo anterior o edema já era acentuado às 24h e desapareceu às 72h, não sem antes evoluir para o padrão leve no subgrupo IP48.

No grupo SC o edema variou de leve a moderado até o subgrupo SC48, desaparecendo em cinco dos seis animais do subgrupo SC72.

Edema em área portal não foi mencionado por Araújo *et al.*, (1996), durante o estudo com o vírus Morumbi. No entanto, dentro do aspecto morfológico das arboviroses, já foi relatado em infecções naturais, pelos vírus da febre amarela

(Vieira *et al.*, 1983) e dengue, bem como vem sendo observado em diagnósticos de casos confirmados, para essas duas doenças no IEC por Barros (IEC dados não publicados, 2000).

Ainda em áreas portais observou-se reação inflamatória, do tipo mononuclear, com neutrófilos ocasionais, sendo que os últimos, não foram mais vistos a partir de 96h pós-inoculação.

O infiltrado inflamatório iniciou leve às 24h, nos três grupos infectados, evoluiu para moderado às 48h e apresentou diferenças mínimas a partir das 96h, como no grupo IC onde já havia desaparecido nos três animais, sendo que no grupo IP às 96h ainda era leve e moderado e, no grupo SC ainda persistia leve em três animais desse horário.

O encontro do infiltrado inflamatório em áreas portais concordam com os achados de Araújo *et al.*, (1996) quando estudaram experimentalmente a infecção pelo vírus Morumbi em camundongos, assim como com os estudos de Peters *et al.*, (1988) e Morril *et al.*, (1990) ao estudarem o RVF em macacos ou ainda com Rippey *et al.*, (1992) ao induzirem infecção com RVF em bezerros quando identificaram infiltrado inflamatório inclusive com polimorfonucleares, neutrófilos, à semelhança do que foi observado no presente experimento. Reação inflamatória linfocitária leve com raros polimorfonucleares, neutrófilos, foi observada ainda, em outras arboviroses como na infecção natural pelo vírus da febre amarela (Vieira *et al.*, 1983) e na dengue (Bhamarapravati *et al.*, 1991).

Um outro achado em áreas portais, acompanhando o edema e reação inflamatória foi a dilatação de veia porta, a princípio de apresentação leve nos animais dos grupos IC, IP e SC, atingiu o máximo do padrão que foi moderado às 48

horas, nos três grupos infectados evoluiu para leve e desapareceu a partir das 96h pós-inoculação.

Não se observaram em áreas portais, lesões arteriolares, hiperplasia ductal ou colestase em ductos biliares, nos grupos IC, IP e SC. Coincidindo com o presente achado, Abdel-Wahab & El Baz, (1978) já citavam em seu estudo de infecção natural com o vírus RVF ausência de hiperplasia de ductos biliares. Esta ausência também ocorre nas infecções naturais com os vírus da dengue e febre amarela em diagnósticos realizados por Barros (IEC dados não publicados, 2000).

O teste imuno-histoquímico não demonstrou presença de antígeno em áreas portais em nenhum dos animais infectados, em todo o experimento. Esta ausência foi constatada também, em casos de infecção experimental por RVF (Arborio & Hall 1989) e nas infecções naturais por dengue e febre amarela observados por Hall *et al.*, (1991) e Barros (IEC dados não publicados, 2000).

Na infecção dos camundongos pelo vírus Morumbi ficou claro ainda, o comprometimento dos lóbulos. Assim nos hepatócitos ocorreram lesões do tipo tumefação celular, metamorfose gordurosa, corpúsculo acidófilo e regeneração.

A tumefação celular ou degeneração hidrópica ocorre devido ao acúmulo de água e eletrólitos, no interior da célula, que aumenta de volume e leva a alteração da membrana (Dias e Moraes, 1973).

Apesar das variações de intensidade observadas dentro de um mesmo subgrupo, tumefação celular foi percebida inicialmente no subgrupo IC24, onde havia predomínio da apresentação moderada, atingiu o máximo da apresentação nos animais do subgrupo IC48.

O mesmo padrão detectado no grupo IC foi observado no grupo IP.

No grupo SC, a tumefação já era intensa a partir do subgrupo SC24, decrescendo para moderada no subgrupo SC48, regredindo com o avançar das horas, como nos dois outros grupos já descritos.

A tumefação observada no presente experimento é similar àquela já estudada por Araújo M.T., (UFPA dados não publicados), 1994 no experimento com os *Phlebovirus* Candiru e Itaituba.

Metamorfose gordurosa foi observada em alguns animais do grupo controle e nos animais do grupo infectado.

No grupo controle, o aparecimento de esteatose relativamente discreta provavelmente ocorreu por distúrbio da nutrição. Como os animais inoculados foram submetidos ao mesmo tipo de dieta, consideramos a esteatose como linha-base no experimento, sendo considerável o aumento de tal lesão nos animais inoculados.

Ainda não está esclarecida a gênese da esteatose na infecção por *Phlebovirus*, no entanto sabe-se que de um modo geral, os agentes lesivos causam esteatose por interferirem nos diferentes estágios do metabolismo lipídico (Dias e Moraes, 1973).

Metamorfose gordurosa apresentou-se leve desde o início da infecção no grupo IC até o último horário de sacrifício que foi às 96 horas. Esta observação não se assemelhou àquela por Araújo *et al.*, (1996) quando estudaram o vírus Morumbi onde encontraram por via IC degeneração gordurosa apenas nos animais do quarto ou quinto dia de inoculação, correspondente ao presente estudo ao subgrupo IC 96.

No grupo IP, a degeneração gordurosa mostrou-se intensa já às 24h pós-inoculação, e evoluiu para leve a partir das 48h pós-inoculação.

Assim como no grupo IC a metamorfose gordurosa no grupo SC iniciou leve às 24h pós-inoculação, manteve-se neste padrão até às 72h em dois animais dos seis desse subgrupo, como também foi observada no subgrupo IP 72 muito embora predominasse a ausência da mesma entre os animais do subgrupo IP 72 e SC72.

Vale ressaltar aqui que alguns animais do presente estudo apresentaram às 48h predomínio da lesão degenerativa gordurosa bastante parecido com o caso descrito por Barros *et al.*, (1992), para febre amarela em criança da tribo Yanomami e quando associada à necrose faz lembrar casos graves de febre amarela onde a metamorfose tem apresentação macro e microvesicular, (Strano, 1976; Bogliolo, 1981; Coimbra *et al.*, 1987; Monath, 1987; Brito *et al.*, 1992).

Os corpúsculos acidófilos se originam pela perda de água pela célula (Vieira *et al.*, 1983) seguida do acúmulo de proteínas desnaturadas (Pereira, 1998), que levam a contração e condensação de suas estruturas, fragmentando-se em pequenas porções, com picnose do núcleo.

Apoptose significa morte celular programada, cujo aparecimento pode estar ligado a eventos fisiológicos e patológicos (Araújo, 1990). Entre os últimos, estão os produtos virais específicos que podem ser indutores de apoptose. Algumas vantagens para o agente viral podem ser observadas durante a apoptose como a inclusão por membrana do conteúdo celular completo, incluindo progenes virais formando corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos adjacentes. Este processo leva à proteção viral devido restringir a reação inflamatória que fica limitada, favorecendo a progressão da infecção. Por outro lado, os vírus englobados dentro das vesículas apoptóticas ficam protegidas da inativação dos anticorpos e proteases, além do que esses corpos servem, ainda, de proteção para todos

aqueles vírus que ainda não desenvolveram sistema de escape ao processo imune (Roulston *et al.*, 1999).

Destaque deve ser dado aos corpúsculos acidófilos que acompanharam as outras alterações desde às 24h pós-inoculação que haviam sido referidos por Araújo *et al.*, (1996), quando descreveram a presença de corpúsculos desde as 24h em camundongos recém-nascidos, inoculados com *Phlebovirus* por via IC.

Neste experimento, no grupo IC às 24h o número de corpúsculos foi bastante reduzido, atingindo o padrão moderado no subgrupo IC48, também observado por Araújo *et al.*, (1996), no experimento com o mesmo arbovirus, bem como no subgrupo IC72.

No grupo IP ocorreu predomínio da apresentação leve dos corpúsculos, porém como no grupo anterior, evoluiu para o padrão moderado no subgrupo IP48 e atingiu o máximo de intensidade no subgrupo IP72 diferindo do grupo anterior que era de padrão moderado, nesse mesmo horário.

Já no grupo SC a apresentação dos corpúsculos foi leve, como nos dois grupos anteriormente descritos às 24h, atingindo o padrão moderado no subgrupo SC48, bastante parecido com que foi visto no grupo IC, no mesmo horário.

Achados similares com necrose hepática acompanhada da presença de corpúsculos acidófilos foram observados (Araújo M. T., dados não publicados, 1994), na infecção experimental com os *Phlebovirus* CDU e Itaituba e por Pifat & Smith, 1987, quando estudaram experimentalmente o arbovirus PT. Saliente-se que tanto o vírus CDU como o PT, até o momento, estão associados somente a quadros de doença autolimitada.

Corpúsculos acidófilos foram vistos ainda, na infecção natural pelo RVF por Van Velden *et al.*, (1977), por Abdel-Wahab & El Baz, (1978), no Egito por Arborio & Hall (1989) ou por Peters & Slone (1982); Peters *et al.*, (1988) e Morril *et al.*, (1990), no estudo experimental em macacos com RVF, ou por Rippey *et al.*, (1992), em estudo experimental com RVF em bezerros ou Van Der Lugt *et al.*, (1996), ao estudarem ovelhas inoculadas experimentalmente com RVF.

Na infecção natural por Flavivirus como nos casos fatais de febre amarela e dengue já foram descritos corpúsculos acidófilos tipo Councilman – Rocha Lima. Assim a presença de corpúsculos isolados e esparsos em nosso experimento às 24h pós-inoculação em todos os três grupos (IC, IP e SC) parecem bastantes semelhantes às formas de lesão leve da febre amarela onde a necrose aparece salpicada (Bogliolo, 1981).

Na infecção com o vírus Morumbi observada nos três grupos estudados às 48h pós-inoculação onde ocorre razoável número de corpúsculos acidófilos ou até de modo intenso como no subgrupo IP 72, faz lembrar a forma grave da febre amarela (Strano, 1976; Bogliolo, 1981; Coimbra *et al.*, 1987; Monath, 1987; Brito *et al.*, 1992) diferindo apenas na distribuição das lesões que na infecção pelo vírus Morumbi era irregular, sem preferência nos lóbulos, e na febre amarela como é conhecida predomina em área mediolobular (ou zona 2 do ácino).

Nas alterações morfológicas induzidas pelo vírus Morumbi observadas às 24h, nos três grupos estudados, quando sua distribuição ficou mais próxima da vênula hepática, acompanhada de raros corpúsculos acidófilos além de hiperemia dos sinusóides adjacentes em muito se assemelhou com as observadas nos casos de dengue hemorrágica fatal como referidas por Halstead (1980); Henschal & Putnak

(1990); Bhamarapravati *et al.*, (1991); WHO (1997); Gubler (1998) e por Barros (IEC dados não publicados, 2000).

Foram vistos ainda sinais de regeneração celular que no grupo IC foram observados inicialmente de modo leve no subgrupo IC24, tornaram-se moderados no subgrupo IC96.

No grupo IP, assim como no anterior detectou-se regeneração celular às 24h pós-inoculação, bastante discreta, como o grupo anteriormente descrito evoluiu para moderada a partir do subgrupo IP72.

Assim como nos dois grupos anteriores, a regeneração celular era discreta às primeiras horas e evoluiu para moderada a partir do subgrupo SC96.

O infiltrado inflamatório lobular chamou atenção nos três grupos estudados. Predominou como leve já no subgrupo IC24, no entanto, tornou-se moderado nos subgrupos IC48 e IC72.

No grupo IP já se identificava infiltrado inflamatório desde às 24h. Este infiltrado atingiu o ponto máximo de intensidade no subgrupo IP72, diferindo assim do primeiro grupo.

No grupo SC o infiltrado também foi visto desde às 24h pós-inoculação, embora em um só animal do subgrupo, sendo que o máximo atingido da apresentação moderada ocorreu no subgrupo SC48, à semelhança do que ocorreu com o grupo IC.

Infiltrado inflamatório lobular próximo às células necróticas visto no presente estudo, já havia sido observado por Peters & Slone (1982) e Peters *et al.*, (1988) quando estudaram o RVF, ou ainda no estudo de casos fatais de dengue hemorrágico onde os neutrófilos foram visualizados em meio a mononucleares por Bhamarapravati *et al.*, (1991).

Do ponto de vista do estudo imuno-histoquímico, este exame demonstrou bons resultados, com imunorreacção presente no citoplasma de células hepáticas preservadas e naquelas em necrose e também naquelas fagocitadas pelas células de Kupffer.

No grupo IC, a presença do antígeno foi inicialmente observada de distribuição leve às 24h pós-inoculação, foi visto na apresentação moderada às 48h e 72h pós-inoculação, após o que o depósito do antígeno ficou bastante reduzido. De um modo geral a distribuição do antígeno predominou em zona centrolobular e mediozonal.

No grupo IP às 24h não foi detectado antígeno no tecido hepático, diferindo assim dos achados observado no grupo IC. No entanto, às 72h pós-inoculação a quantidade de antígeno no interior da célula era bastante intensa em contraste com o grupo IC, onde o padrão máximo observado foi moderado.

À semelhança do que ocorreu no grupo IP, não houve imunorreacção no fígado dos animais no grupo SC às 24h pós-inoculação. Só foi observada às 48h e variou de leve a moderada, sendo que até às 72h ainda mantinha-se na apresentação moderada. Como nos dois grupos anteriormente descritos a presença de antígenos já era leve às 96h, nos cinco animais. No entanto, como nesse grupo os animais infectados sobreviveram até às 120h surpreendeu-nos, ainda observar presença moderada de antígeno em três dos cinco animais, quando esperávamos detectar presença leve ou até mesmo ausência de reacção para o antígeno.

Até onde pode ser levantado este parece ser o primeiro estudo com base na imuno-histoquímica para a infecção com o vírus Morumbi. No entanto, estudos da infecção natural e experimental com RVF, revelaram achados similares (Arborio & Hall, 1989; Rippey *et al.*, 1992; Van Der Lugt *et al.*, 1996), aos observados

no presente estudo. O antígeno, no presente estudo foi detectado a partir das 24h pós-inoculação, quando teve início o sacrifício dos animais. Na pesquisa do antígeno feita por Van Der Lugt *et al.*, (1996), o encontro do antígeno foi mais precoce, ou seja, às 18h pós-inoculação visto que iniciou o sacrifício dos animais às 6h pós-inoculação. Em contraste Rippey *et al.*, (1992), só vieram observar lesão histológica e presença de antígeno viral no 3º dia pós-inoculação quando da realização do seu experimento utilizando RVF, por via subcutânea em gado jovem (novilho). Além da similaridade da detecção de antígeno vista com outro *Phlebovirus* é possível se observar ainda com Flavivirus, como comprovam os estudos de imuno-histoquímica para febre amarela em humanos (Hall *et al.*, 1991; Brito *et al.*, 1992), que revelaram a presença de antígeno exclusivamente no citoplasma das células hepáticas, da área mediozonal (zona 2 do ácino), ou de modo difuso como observado por La Monte *et al.*, (1983), diferindo daquelas observadas na imunorreação para os casos fatais de dengue, quando os antígenos são observados predominantemente nas células dos sinusóides, como as células de Kupffer e do endotélio vascular (Hall *et al.*, 1991; Barros, dados não publicados, 2000).

7.2. CONHECIMENTOS ATUAIS DE MECANISMOS PATOGENÉTICOS

Até o momento, são desconhecidos os mecanismos para esclarecer a ação dos vírus do grupo Phlebotomus no organismo humano. A literatura mostra o que ocorre em linhas gerais em uma infecção viral.

A ação do vírus sobre o hospedeiro parece estar na dependência de fatores virais como: dose infectante do vírus e a via de entrada, e de fatores

humanos específicos como: estado imunitário, constituição genética, alteração hormonal, estado nutricional e idade (Tyler & Fields, 1996).

O vírus atingindo o homem por diversas vias de entrada (pele, tratos respiratórios, gastro intestinal, genito-urinário e conjuntivo) poderá levar a exposição com entrada do vírus na célula humana, sendo que o hospedeiro sofre a exposição e não se infecta. Na ocorrência de multiplicação viral incompleta, o hospedeiro responde à infecção, porém não apresenta sintomas clínicos (infecção assintomática). Poderá ocorrer inclusão viral e formação de corpúsculos de inclusão ou transformação celular ou disfunção celular. Como resposta do hospedeiro, a doença poderá ser branda, moderada ou severa. Na ocorrência de lise celular que compromete grande extensão de órgãos, poderá sobrevir morte do hospedeiro (Tyler & Fields, 1996).

Ocorrendo a penetração do vírus no hospedeiro, depois da primeira replicação que se dá em área próxima do local de entrada, poderá ocorrer uma infecção localizada ou uma disseminação sistêmica, que pode ser por via sangüínea, linfática ou axisônica. Na dependência do vírus implicado, este poderá atingir tecidos e células do organismo de acordo com o seu tropismo (Tyler & Fields, 1996).

Assim, os estudos experimentais vêm demonstrando que após a entrada do vírus no organismo por uma das diversas vias, ocorre localização do mesmo nos linfonodos regionais, onde se dá a multiplicação do vírus e sua liberação para a corrente sangüínea, ocorrendo assim a viremia primária. Quando os vírus localizam-se nas células do sistema fagocítico-mononuclear incluindo baço e fígado, sofrem nova multiplicação, podendo inclusive determinar necrose, para em seguida serem liberados para a corrente sangüínea, levando ao aparecimento da viremia secundária e, assim, alcançar ou atingir os órgãos e tecidos pelos quais o vírus

apresenta afinidade (tropismo), determinando lesões teciduais, de extensão bastante variável (Tyler & Fields, 1996).

No hospedeiro, os agentes virais poderão defrontar-se com fatores específicos que poderão alterar suas ações. Assim, se estiverem preservados os mecanismos de defesa do hospedeiro, o agente poderá ser imediatamente eliminado pelos mecanismos naturais, não imunes. Se previamente reconhecido pelo sistema imune, irá induzir no hospedeiro a produção de interferons que favoreceram a expressão de MHC da classe I na célula infectada, elevando assim, a quantidade de antígeno viral associada a essas moléculas na membrana celular. Devido a isso, as células infectadas sofrem ação de células T citotóxicas que reconhecem epitopos via MHC da classe I, destruindo as células portadoras de antígenos. Os linfócitos TH1 podem ser estimulados pelos antígenos virais a liberarem fatores citotóxicos (linfotoxinas e/ou $TNF\beta$) ou estimuladores de macrófagos que ativados, liberam fatores citotóxicos que destroem as células infectadas. As células NK ocasionam a morte, de células infectadas que reduziram ou anularam a expressão do MHC classe I. Os anticorpos contribuem também para lisar células infectadas por meio da ativação do sistema complemento ou pela citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (Nash, 1997). Em caso da resposta imune parecer exarcebada, a doença tornar-se-á grave nos casos de resposta imune deprimida, o hospedeiro poderá ficar susceptível a outras infecções.

Um outro fator que interfere na infecção viral é a constituição genética do indivíduo, como os genes que dependem não só de receptores celulares como da produção e ação do interferon α ou β que irão induzir o aparecimento de proteína inibidora da síntese de mARN viral (Nash, 1997).

A alteração hormonal do hospedeiro seria outro fator a contribuir para a severidade da infecção, como ocorre na gravidez e na terapia por corticosteroides que deprimem os mecanismos de defesa do hospedeiro (Tyler & Fields, 1996).

Contribuem ainda para a infecção viral grave a idade (a baixa idade e a velhice) e o estado nutricional do hospedeiro como a desnutrição (Tyler & Fields, 1996)

Considerando os achados do presente estudo com os que estão relatados na literatura sobre a patogenia viral, verificou-se que o vírus Morumbi, ao ser inoculado por três diferentes vias (IC, IP e SC), atingiu a corrente sangüínea, por meio desta causou infecção sistêmica, havendo comprometimento hepático, demonstrando assim seu tropismo para o fígado dos camundongos inoculados, confirmados não só pela presença da hepatite leve já às 24 horas, no grupo IC, bem como pela detecção nesse mesmo horário, do antígeno viral no tecido.

No entanto às 48 horas nos três grupos, a lesão evoluiu para moderada em correspondência também com os achados de imuno-histoquímica, demonstrando-se assim a ocorrência de multiplicação viral intensa, havendo um certo paralelismo entre as vias IC e SC às 72 horas, sendo que neste horário, das três vias a que mais se destacou foi a IP por induzir lesões bem mais acentuadas no fígado, paralelamente à detecção da maior concentração de antígeno viral.

Como vimos, no presente estudo, o modelo de infecção experimental de camundongos pelo vírus Morumbi foi confirmado excelente para o estudo seqüencial das lesões hepáticas, pelas vias de inoculação aqui selecionadas.

Além da importante questão do desenvolvimento da encefalite, outros aspectos relacionados à patogenese da hepatite por vírus Morumbi restam a ser respondidas, adiantando-se especialmente:

- Seriam as lesões hepatocelulares decorrentes de ação citopática direta do vírus?

- Haveria correlação entre carga viral e/ou da expressão de genes virais específicos e o surgimento das lesões hepatocelulares, mais especificamente, dos corpos apoptóticos de Councilman e da esteatose?

- Como a resposta linfocitária do hospedeiro interfere na produção das lesões e na replicação viral.

Fica, portanto, nossa expectativa de que estudos futuros, usando o presente modelo de infecção experimental, possam contribuir para elucidação destas relevantes questões.

8. CONCLUSÕES

Com base nos achados morfológicos e imuno-histoquímicos concluiu-se que:

- a) O modelo de infecção experimental em camundongos foi confirmado excelente para o estudo das lesões associadas à infecção pelo vírus Morumbi, podendo ser selecionada a via IP como referencial.
- b) Em todos os casos, o vírus Morumbi foi detectado através de seu antígeno, no tecido hepático de camundongos Swiss, quando inoculados pelas vias IC, IP ou SC.
- c) A presença de antígeno do vírus Morumbi no fígado desses camundongos associou-se ao aparecimento de hepatite aguda, com necrose focal.
- d) Hepatite aguda intensa pôde ser observada em fígado de camundongos sacrificados 72h após-inoculação com o vírus Morumbi por via IP.
- e) Colestase não foi alteração freqüente na hepatite experimental pelo vírus Morumbi, quando inoculado por via IC, IP ou SC.
- f) A hepatite aguda mostrou-se limitada, neste experimento, tendendo a desaparecer na maioria dos camundongos inoculados, com avançar das horas, o que foi demonstrado pelos achados de regeneração hepática.
- g) Antígeno do vírus Morumbi teve localização predominantemente intracitoplasmática, padrão granular, nos hepatócitos e células de Kupffer.
- h) Antígeno do vírus Morumbi foi detectado em fígado de animais experimentalmente inoculados com o vírus, a partir de 24 horas nos inoculados por via IC e a partir de 48 horas nos inoculados pelas vias IP e SC.

ABSTRACT

Morumbi virus is a member of Phlebotomus Fever serogroup (*Bunyaviridae* family, *Phlebovirus* genus), native from the Brazilian Amazon region. Its vector is unknown, but is supposed to be, transmitted by phlebotomine sandflies. It was isolated in 1988 from a human presenting an acute febrile illness. When inoculated in the brain of Newborn Swiss mice, this arbovirus showed visceral tropism, including liver damage. In order to establish the anatomopathological and immunohistochemical characteristics in the liver of albino Swiss suckling mice experimentally infected with Morumbi virus; to assess the differences of tropism of the virus in the liver following the intra cerebral, intra peritoneal or subcutaneous routes of inoculation; to detail the sequence of anatomical and pathological events in the liver; to demonstrate the location of the viral antigen in the hepatic tissue during the experimental assay; and to study the possible relationship between the anatomopathological and immunohistochemical findings, an experimental study was conducted with 71 Newborn Swiss mice (two or three days of age), distributed as follows: 21 received intra cerebral inoculation (IC), 21 received intraperitoneal inoculation (IP) and 29 received subcutaneous inoculation (SC). 0.02ml of virus suspension was used as the infectious dose. The control was comprised of 30 mice that were not inoculated. Subgroups of 8 mice (6 inoculated, 2 controls) were euthanized daily, at intervals of 24 - 96 hours in the IC and IP groups, and until 120 hours in the SC group. Liver specimens from all mice were fixed in a 10% neutral formalin solution, then embedded in paraffin wax to obtain 5µm sections that were stained with haematoxylin/eosin for morphological analysis. Immunohistochemical technique (Envision System, DAKO, USA) was employed in additional sections, using alkaline phosphatase and hyper-immune anti-Morumbi virus serum prepared into suckling mice, to detect the viral antigen. 6 patterns of portal lesion and 9 patterns of lobule lesion were studied in a scale from zero (0) to three (+++), where zero represented absence of lesion and three represented severe lesion. Light microscopy examination revealed that Morumbi virus was able to produce hepatic lesions in the portal and lobular areas when inoculated in mice in three different routes, raising an acute hepatitis, in which bodies similar to Councilman – Rocha Lima bodies were observed, irregularly distributed in the lobules. The appearance of those bodies occurred 24 hours post-inoculation (pi), with a peak at 72 hours pi in mice inoculated. The immunohistochemical technique showed mild presence of viral antigen from 24 hours after inoculation in IC group and from 48 hours after in IP and SC groups, showing a certain parallelism between the detection of viral antigens and the morphological lesions. Maximum detection of the viral antigen was observed in IP route, specially those mice euthanized at 72 hours pi. General distribution of the antigen was concentrated in the hepatic lobules, in the cytoplasm of normal and necrotic hepatocytes, as well as inside the Kupffer cells, without any preference for the three lobule areas. The following conclusions are made: i) experimentally infected mice model was excellent to study the Morumbi virus-induced lesions, with preference to IP route; ii) in all inoculated routes (IP, IC and SC) there was evidence of Morumbi virus infection, with a remarkable detection of its antigen in the hepatic tissue of Swiss mice; iii) Morumbi virus antigen detected in the liver of Swiss mice was associated with acute hepatitis and with focal necrosis; iv) an intense acute hepatitis occurred in the liver of euthanized mice 72 hours pi with Morumbi virus by the intraperitoneal route but was not observed in the other two used routes; v) in this experiment, acute hepatitis was limited, showing a clear tendency to disappear in the

follow up in the majority of inoculated animals; vi) cholestasis was not very often observed in the experimental hepatitis due to Morumbi virus; vii) Morumbi virus antigen was detected predominantly in the cytoplasm and was exhibiting a granular pattern in hepatocytes and Kupffer cells; viii) Morumbi viral antigen was detected as early as 24 hours in hepatic tissue in IC route and 48 hours after IP and SC routes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL- WAHAB, K. S. E. & EL BAZ, L. M. Rift Valley fever virus infections in Egypt: pathological and virological findings in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, n. 4, p. 392 – 396, 1978.
- ACCARDI, L., GRO, M. C., DI BONITO, P., GIORGI, C. Toscana virus L segment: molecular cloning, coding strategy and aminoacid sequence in comparison with other negative strand RNA viruses. *Virology*, v. 161, p. 91, 1993.
- AITKEN, T. H. G., WOODALL, J.P., PAES DE ANDRADE A. H., BENSABATH, G., SHOPE, R. E. Pacui virus, Phlebotomine flies and small mammals in Brazil: an epidemiological study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 24, n. 2, p. 358-368, 1975.
- ARAÚJO, R. *Compêndio de patologia da nutrição*. Belém: Universidade Federal do Pará, 1990. pt. 1: Patologia geral da nutrição. P.3-22.
- ARAÚJO, M. T. F., ARAÚJO, R., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Infecção experimental com arbovírus Morumbi. In: *Congresso Brasileiro de Infectologia*, 9, 1996, Pernambuco. Anais Pernambuco: [s.n], 1996. p. 170.
- ARBORIO, M. & HALL, W. C. Diagnosis of a human case of Rift Valley fever by immunoperoxidase demonstration of antigen in fixed liver tissue. *Research in Virology*, v. 140, p. 165-168, 1989.
- ÁVILA, A. C., HAAN, P., SMEETS, M. L. L., RESEND, R. O., KORMELINK, R., KITAJIMA, E. W., GOLDBACH, R. W., PETERS, D. Distinct levels of relationships between tospovirus isolates. *Archives of Virology*, v. 128, p. 211 – 227, 1993.
- BARROS, V. L. R., MORAES, M. A. P., BENSABATH, G., SILVA, M. A. Aspecto histológico incomum em caso de febre amarela ocorrido no grupo indígena Yanomami. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, n. 4, p. 279-280, 1992.
- BARTELLONI, P. J. & TESH, R. B. Clinical and serologic responses of volunteers infected with Phlebotomus fever virus (Sicilian type). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 25, n. 3, p. 456-462, 1976.
- BEATY, B. J., CALISHER, C. H. Bunyaviridae-natural history. *Current Topics Microbiology and Immunology*, v. 169, n. 27, 1991.
- BEHBEHANI, A. M., HILLER, M. S., LENAHAAN, M. F., WENNER, H. A. Responses of monkeys to California encephalitis, Sicilian, Sand-fly, and Turlock arboviruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 16, n. 1, p. 63-73, 1967.

- BHAMARAPRAVATI, N., TUCHINDA, P., BOONYAPAKNAVIK, V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 61, p. 500-510, 1991.
- BISHOP, D. H. L., CALISHER, C. H., CASALS, J., CHUMAKOV, M. P., GAIDAMOVICH, S. Y., HANNOUN, C., LVOV, D. K., MARSHALL, I. D., OKER-BLOM, N., PETTERSSON, R. F., PORTERFIELD, J. S., RUSSELL, P. K., SHOPE, R. E., WESTAWAY, E. G. *Bunyaviridae. Intervirology*, v. 14, p. 125-143, 1980.
- BISHOP, D. H. L., SHOPE, R. E. *Bunyaviridae*. In: FRAENKEL-CONRAT, H., WAGNER, R. A. (ed). *Comprehensive virology*. New York: Plenum Press, 1979. v. 14, p. 1-156.
- BOGLIOLO, L. Fígado e vias biliares. In: *Bogliolo Patologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. p. 658-743.
- BRAITON, A., CORBISIERO, R., CORRADINI, S., FIORENTINI, C., CIUFOLINI, M. G. Toscana virus infections of the central nervous system in children: a report of 14 cases. *Journal of Pediatrics*, v. 132, n. 1, p. 144-148, 1998.
- BRÉS, P. Impact of arboviruses on human and animal health. In: Monath, T. P. *The arboviruses*. Flórida: CRC Press, 1988, v.1, p. 1-18.
- BRITO, T. SIQUEIRA, S. A. C., SANTOS, R. T. M., NASSAR, E. S., COIMBRA, T. L. M., ALVES, V. A. F. Human fatal yellow fever. Immuno-histochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathology Research and Practice*, v. 188, p. 177-181, 1992.
- CALISHER, C. H. *Bunyaviridae*, in: Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.*, n.2, p. 273, 1991.
- CALISHER, C. H. Evolutionary significance of the taxonomic data regarding bunyaviruses of the family *Bunyaviridae*. *Intervirology*, v. 29, p. 268-276, 1988.
- CALISHER, C. H. History, classification, and taxonomy of viruses in the family *Bunyaviridae*. In: Elliot, R. M. (ed.). *The Bunyaviridae*. Scotland: Universit of Glasgow, Institute of Virology, 1996. v. 1, p.1-15.
- CALISHER, C. H., McLEAN, R. G. SMITH, G. C., SZMYD, D. M., MUTH, D. J., LAZUICK, J. S. Rio Grande - a new Phlebotomus fever group virus from South Texas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 26, n. 5, p. 997-1002, 1977.
- CASALS, J. The arthropod-borne group of animal viruses. *Transactions New York Academic Science*, v. 19, p. 219-235, 1957.
- COIMBRA, T. L. M., IVERSSON, L. B., SPIR, M., ALVES, V. A. F., BOULOS, M. Investigação epidemiológica de casos de febre amarela na Região Noroeste do

- Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 21, n. 3, p. 193-199, 1987.
- COLLET, M. S., PURCHIO, A. F., KEEGAN, K., FRAZIER, S., HAYS, W., ANDERSON, D. K., PARKER, M. D., SCHMALJHON, C., SCHIMIDT, J. Complete nucleotide sequence of the mRNA segment of Rift Valley fever virus. *Virology*, v.144, p.220, 1985.
- DEUTMAN, A. F. & KLOMP, H. J. Rift Valley fever retinitis. A. M. J. *Ophthalmology*, v. 92, n.1, p. 38-42, 1981.
- DIAS, L.B., MORAES, M.A. Hepatite de Labrea. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 15(2): 86-93, 1973.
- EHRNST, A. PETERS, C. J., NIKLASSON, B., SVENDMYR, A. HOLMGREN, B. Neurovirulent Toscana virus (A sandfly fever virus) in swedish man after visit to Portugal. *The Lancet*, p. 1212-1213, May 1985.
- EITREM, R., NIKLASSON, B. WEILAND, O. Sandfly fever among swedish tourists. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 23, p. 451-457, 1991a.
- EITREM, R., STYLIANOU, M., NIKLASSON, B. High. prevalence rates of antibody to three sandfly fever viruses (Sicilian, Naples and Toscana) among cypriots. *Epidemiology and Infection*, v. 107, p. 685-691, 1991b.
- EITREM, R., VENE, S., NIKLASSON, B. Incidence of sand fly fever among swedish United Nations soldiers on Cyprus during 1985. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 43, n. 2, p. 207-211, 1990.
- FONTENILLE, D., TRAORE-LAMIZANA, M., DIALLO, M., THONNON, J., DIOGOUTTE, J. P., ZELLER, H. G. New vectors of Rift Valley fever in west África. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 2, p. 289-293, 1998.
- GONZALEZ - SCARANO & F. NATHANSON, N. *Bunyaviridae*, In: Fields, B. N., Knipe, D.M. (eds) *Fields Virology*, 3. ed., Philadelphia: Raven Press, 1996. p. 1473-1504.
- GORDON, R. D. Outros vírus transmitidos por artrópodes. In: Bennett, J. & Plum, F. (ed.) *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, v.2, p.1991-2002.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 480-496, 1998.
- HALL, W. C., CROWELL, T. P., WATTS, D. M., BARROS, V. L. R., KRUGER, H., PINHEIRO, F., PETERS, C. J. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin - embedded human liver by immunohistochemical analysis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v. 45, n. 4, p. 408-417, 1991.

- HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever - a public health problem and a field for Research. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 58, n. 1, p. 1-21, 1980.
- HENCHAL, E. A. & PUTNAK, J. R. The Dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, p. 376-396, 1990.
- HERVE, J. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., SÁ FILHO, G. C., TRAVASSOS DA ROSA, J. F., PINHEIRO, F. P. Mise em évidence de la transmission transovarienne du virus Pacui chez *Lutzomyia flaviscutellata* (Phlebotominae). Consequences épidémiologiques. Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Ent. Méd. et Parasitol., vol. XXII, n° 3, 1984: 207-212.
- HERVÉ, J. P., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., SÁ FILHO, G. C. Arboviroses: aspectos ecológicos. In: *Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical*. Belém, 1986. v. 1, p. 409-437.
- IHARA, T., MATSUURA, Y. BISHOP, D. H. L. Analyses of the mRNA transcription processes of Punta Toro Phlebovirus (*Bunyaviridae*). *Virology*, v. 147, p. 317-325, 1985a.
- IHARA, T., SMITH, J., DARYAMPLE, J. M., BISHOP, D. H. L. Complete sequences of the glycoprotein and mRNA of Punta Toro *Phlebovirus* compared to those of Rift Valley fever virus. *Virology*, p. 144-246, 1985b.
- KARABATSOS, N. (ed). International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3 ed. San Antonio, Texas: *American Society for Tropical Medicine and Hygiene*, 1985. p. 663.
- LA MONTE, S. M., LINHARES, A. L., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P. Immunoperoxidase detection of yellow fever virus after natural and experimental infections. *Tropical and Geographical Medicine*, v. 35, p. 235-241, 1983.
- LAUGHLIN, L. W., MEEGAN, J. M., STRAUSBAUGH L. J., MORENS, D. M., WATTEN, R. H. Epidemic Rift Valley fever in Egypt: observations of the spectrum of human illness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 6, p. 630-633, 1979.
- LEDUC, J. W., CUEVAS, M. GARCIA, M. The incidence and prevalence of Phlebotomus fever group viruses in Panama. In: *SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ARBOVIRUS DOS TRÓPICOS E FEBRES HEMORRÁGICAS*. 1980, Belém. *Anais...* Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1982. p. 385-390.
- LEVITT, J., NAUDÉ, W., DU, T., POLSON, A. Purification and electron microscopy of pantropic Rift Valley fever. *Virology*, v. 20, p. 530-533, 1963.

- McCLAIN, D. J., SUMMERS, P. L., PRATT, W. D., DAVIS, K. J., JENNINGS, G. B. Experimental infection of nonhuman primates with Sandfly Fever virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 56, n. 5, p. 554-560, 1997.
- McLEAN, D. M. Grupos de arbovirus de La fiebre pappataci (por flebótomos) y changuinola. In: Rhodes, A. J., Rooyen, C. E. V. (ed). *Tratado de Virologia*. Barcelona: Toray, 1972. p. 758-760.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico*. 3. ed. São Paulo: EPU, 1998. p. 295.
- MIMS, C. A. & WHITE, D. O. Infection and the spread of viruses throught the body. In: Mims, C. A. & White, D. O. *Viral pathogenesis and immunology*. Oxford: Blakwell, 1988. p. 39 - 85.
- MONATH, T. P. Arboviruses of Central and ok South America. In: FEIGIN, R. D. & CHERRY, J. D. *Textbook of Pediatric Infections Diseases*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. v. 2, p. 1423-1435.
- MONATH, T. P. Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. *Reviews of Infections Diseases*, v. 9, n. 1, p.165-175, 1987.
- MORRIL, J. C., JENNINGS, G. B., JOHNSON, A. J., COSGRIFF, T. M., GIBBS, P. H., PETERS, C. J. Pathogenesis of Rift Valley fever in rhesus monkeys: role of interferon response. *Archives of Virology*, v. 110, p. 195-212, 1990.
- MURPHY, F. A., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A. W. MARTELLI, G. P. MAYO, M. A., SUMMERS, M. D. (ed). *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses*. *Archives of virology*, . suppl. 10, p. 300-315, 1995
- NASH, T. Imunidade aos vírus. In: Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. *Imunologia*. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 16.1 - 16.8
- NICOLETTI, L., VERANI, P., CACIOLLI, S., CIUFOLINI, M. G., RENZI, A., BARTOLOZZI, D., PACI, P., LEONCINI, F., PADOVANI, P., TRAINI, E., BALDERESCHI, M., BALDUCCI, M. Central nervous system involvement during infection by *Phlebovirus Toscana* of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 45, n. 4, p. 429-434, 1991.
- NIKLASSON, B. & EITREM, R. Sandfly fever among swedish un troops in Cyprus. *The Lancet*, p. 1212, 1985.
- OLIVEIRA, L. H. S. Introdução ao estudo dos vírus. In: Oliveira, L. H. S. *Virologia humana*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. p. 1-18.
- PARKER, M. D., HEWELLT, M. J. The 3' terminal sequences of Uukuniemi and Inkoo vírus RNA genome segments. In: Bishop, D. H. L., Compans. R. W. (ed). *Replication of negative strand viruses*. Amsterdam: Elsevier, 1981. p. 125-145, 1981.

- PETERS, C. J., JONES, D., TROTTER, R., DONALDSON, J., WHITE, J., STEPHEN, E., SLONE, JR. T. W. Experimental Rift Valley fever in rhesus macaques. *Archives of Virology*, v. 99, p. 31-44, 1988.
- PETERS, C. J., SLONE, T. W. Inbred rat strains mimic the disparate human response to Rift Valley fever virus infection. *Journal of Medical Virology*, v. 10, p. 45-54, 1982.
- PETTERS, C. J. Emergence of Rift Valley fever. Factors in the emergence of arbovirus diseases. In: Saluzzo, J.F., Dodet, B. (ed.) *Factors in the emergence of arbovirus diseases*. Paris: Elsevier, 1997, p. 253-264.
- PETTERSON, R. F., HEWLETT, M. J., BALTIMORE, D., COFFIN, J. M. The genome of Uukuniemi virus consists of the three unique RNA segments. *Cell*, v. 11, p.51, 1977.
- PETTERSON, R., KÄÄRIÄINEN, L., VON BONSDORFF, C. H., OKER-BLOM, N. Structural components of Uukuniemi virus, a noncubical tick-borne arbovirus. *Virology*, v. 46, p. 721- 729, 1971.
- PIFAT, D. Y., SMITH, J. F. Punta Toro virus infection of C 57 BL/ 6 J mice: a model for phlebovirus-induced disease. *Microbial Pathogenesis*, v. 3, p. 409-422, 1987.
- PINHEIRO, F. P. TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., Arboviroses. In: Veronesi, R., Focaccia, R. (eds.). *Tratado de infectologia*. 2 ed., São Paulo: Atheneu, 1996. p. 169-180.
- PINHEIRO, F. P. Arboviroses. In: *Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical*. Belém, 1986. v. 1, p. 359.
- PINHEIRO, F. P. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. FREITAS, R. B., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses: aspectos clínicos-epidemiológicos. In: *Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical*. Belém, 1986. v. 1, p. 375-408.
- PROPHET, E. B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B., SOBIN, L. H. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington: American Registry of Pathology, 1992. p. 3-80.
- RICE, R. M., ERLICK, B. J. ROSATO, R. R., EDDY, G. A., MOHANTY, S. B. Biochemical characterization of Rift Valley fever virus. *Virology*, v. 105, p. 256, 1980.
- RIPPY, M. K., TOPPER, M. J., MEBUS, C. A., MORRILL, J.C. Rift Valley fever virus - induced encephalomyelitis and hepatitis in calves. *Veterinary Pathology*, v. 29, p. 495-502, 1992.
- ROBESON, G., EL-SAID, L. H., BRANDT, W., DALRYMPLE, J., BISHOP, D. H. L. Biochemical studies on the Phlebotomus fever group viruses (*Bunyaviridae* family). *Journal of Virology*, v. 30, n. 1, p. 339-350, 1979.

- RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., TESH, R. B., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Characterization of two new Phleboviruses associated with human illness from the Amazon Region of Brazil. In: Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S. (ed.). *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998, p. 100-106.
- ROULSTON, A., MARCELUS, R.C., BRANTON, P.C. Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology*, v.53, p.577-628, 1999.
- SABIN, A. Phlebotomus fever. In: RIVER, T. M. (ed). *Viral and Rickettsial diseases of man*. Philadelphia: Lippincott, 1948. p. 454-461.
- SAIKKU, P., VON BONSDORFF, C. H. Electron microscopy of the Uukuniemi virus, an ungrouped arbovirus. *Virology*, v. 34, p. 804, 1968.
- SAIKKU, P., VON BONSDORFF, C.H., OKER-BLOM, N. The structure of Uukuniemi virus. *Acta Virologica*, v. 14, p. 103-107, 1970.
- SANFORD, J. P. Infecções por arbovirus. In: Isselbacher, K. I., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci A. S., Kasper, D.L. *Harrison Medicina interna*. 13. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, 1994. p. 877-881.
- SCHIMIDT, J. R., SCCMIDT, M. L., SAID, M. I. Phlebotomus fever in Egypt. Isolation of Phlebotomus fever viruses from *Phlebotomus papatasi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 20, p. 483-490, 1971.
- SCHMALJOHN, C. S., *Bunyaviridae: the virus and their replication*. In: Fields, B. N. & Knipe, D.M. *Fields Virology*, 3rd. ed., Philadelphia: Raven Press, 1996. p. 1447-1471.
- SCHWARZ, T. F., GILCH, S., JÄGER, G. Aseptic meningitis caused by sandfly fever virus, serotype Toscana. *Clinical Infectious Diseases*, v. 21, p. 669-671, 1995a.
- SCHWARZ, T. F., JÄGER, G., GILCH, S. NITSCHKO, H. Nested RT-PCR for detection of sandfly fever virus, serotype Toscana, in clinical specimens, with confirmation by nucleotide sequence analysis. *Research in Virology*, v. 146, p. 355-362, 1995b.
- SCHWARZ, T. F., JÄGER, G., GILCH, S., PAULI, C. Serosurvey and laboratory diagnosis of imported sandfly fever virus, serotype Toscana, infection in Germany. *Epidemiology and Infection*, v. 114, p. 501-510, 1995c.
- SCHMALJOHN, C. S. *Bunyaviridae: the viruses and their replication*. In: Fields, B. N. & Knipe, *Fields Virology*, 3rd ed., Philadelphia: Raven Press, 1996. p. 1447-1471.
- SIDWELL, R. W., HUFFMAN, J. H., BARNETT, B. B., PIFAT, D.Y. In vitro and in vivo Phlebovirus inhibition by ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, n. 3, p. 331-336, 1988.

- SMITH, J. F., PIFAT, D. Y. Morphogenesis of sandfly fever viruses (*Bunyaviridae* family). *Virology*, v. 121, p. 61, 1982.
- SRIHONGSE, S., JOHNSON, C. M. Human infections with Chagres virus in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 23, n. 4, p. 690-693, 1974.
- STEVENS, A., Lowe, J. Dano e Morte Celular. *Patologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 23-33.
- STRANO, A. J. Diseases caused by viruses: yellow fever. In: BINFORD, C. H., CONNOR, D. H. *Patology of tropical and extraordinary diseases*. Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1976. v. 1, p. 1-11.
- TESH, R. B. Arboviruses of central Asia and the former Soviet Union. In: FEIGIN, R. D. & CHERRY, J. D. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 3rd. ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. v. 2, p.1462-1468.
- _____. Phlebotomus fevers. In: Monath, T. P. *The Arboviruses: epidemiology and ecology*. Florida: CRC Press, 1988. v. IV, p. 16-27.
- TESH, R. B. Febre do Flebótomo. In: Wyngaarden, J. B.; Smith, L. H. *Cecil Tratado de Medicina Interna*. 18ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. v. 2, p. 1589.
- TESH, R. B., PAPAEOVANGELOU, G. Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of Sandyfly fever in Athens, Greece. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 26, n. 1, p. 163-166. 1977a.
- TESH, R. B., BOSHELL, J. S., YOUNG, D. G., MORALES, A. A., CORREDOR, A. A., MODI, G. B., CARRASQUILLA, C. F., RODRIGUEZ, C., GAITAN, M. O. Biology of Arboledas Virus, a new phlebotomus fever serogroup virus. (*Bunyaviridae: Phlebovirus*) Isolated from sand flies in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, n. 6, p. 1310 - 1316, 1986.
- TESH, R. B., BOSHELL, J., YOUNG, D. G., MORALES, A., CARRASQUILLA, C. F. CORREDOR, A., MODI, G. B., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., McLEAN, R.G. RODRIGUEZ, C., GAITAN, M. O. Characterization of five new phleboviruses recently Isolated from sand flies in tropical America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 40, n. 5, p. 529-533, 1989.
- TESH, R. B., CHANIOTIS, B. N., PERALTA, P. H., JOHNSON, K. M. Ecology of viruses isolated from Panamanian Phlebotomine Sandflies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 23, n. 2, p. 258-269, 1974.
- TESH, R. B., MODI, G. B. Maintenance of Toscana virus in *Phlebotomus perniciosus* by vertical transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 36, n. 1, p. 189-193, 1987.

- TESH, R. B., PETERS, C. J., MEEGAN, J. M. Studies on the antigenic relationship among phleboviruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 31, n. 1, p. 149 – 155, 1982.
- TESH, R. B., SAIDI, S., GAJDAMOVIC, S. J., RODHAIN, F., VESENJAK – HIRJAN, J. Serological studies on the epidemiology of sandfly fever in the Old World. *Bulletin World Health Organization*, v. 54, p. 663-674. 1976.
- THONNON, J. PICQUET, M., THIONGANE, Y., LO M., SYLLA, R., VERCRUYSSSE, J. Rift Valley fever surveillance in the lower Senegal river basin: update 10 years after the epidemic. *Tropical Medicine and International Health*, v. 4, n. 8, p. 580-585, 1999.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., NAKAUTTH, C., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses: aspectos virológicos. In: *Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical*. Belém, 1986. v. 1, p. 365 – 373.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TESH, R. B., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PETERSON, N. E. Characterization of eight new Phlebotomus fever serogroup arboviruses (*Bunyaviridae: Phebovirus*) from the Amazon Region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32, n. 5. p. 1164 –1171, 1983.
- 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. *Os arbovirus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo*. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1994. 28 p.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PINHEIRO, F. P., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: Leão, R. N. Q. (Coord.) *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico*. Belém: CEJUP, 1997. p. 207 – 225.
- 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., CRUZI, A. C. R. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region their know 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*. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 19-31.
- TYLER, K. L., FIELDS, B. N. Pathogenesis of viral infections. In: Fields, B. N. & Knipe, D.M. (eds.) *Fields Virology*. 3rd. ed., Philadelphia: Raven Press, 1996, p.173–218.
- VAN DER LUGT, J. J., COETZER, J. A. W., SMIT M. M. E. Distribution of viral antigen in tissues of new-born lambs infected whit Rift Valley fever virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 63, p. 341-347, 1996.

- VAN VELDEN, D. J. J., MEYER, J. D., OLIVER, J. GEAR, J. H. S., MCINTOSH, B. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinico pathological study. *South African Medical Journal*, v. 51, n. 22, p. 867-871, june 1977.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PINHEIRO, F. P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Ciência e Cultura*, v. 44, n. 2/3, p. 117-124, 1992.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., RODRIGUES, S. G., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S. *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72-99.
- VIEIRA, W. T., GAYOTTO, L. C., LIMA, C. P., BRITTO, T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. *Histopathology*, v. 7, p. 195-208, 1983.
- VON BONSDORFF, C. H. & PETTERSON, R. Surface structure of Uukuniemi virus. *Journal of Virology*, v. 16, n.5, p. 1296- 1307, 1975.
- WHITE, D. O., FENNER, F. J. *Bunyaviridae. Medical Virology*. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 509-521.
- WILSON, M. L., CHAPMAN, L. E., HALL, D. B. DYKSTRA, E. A., BA. K., ZELLER, H. G., TRAORE-LAMIZANA, M., HERVY, J. P., LINTHICUM, K. J., PETERS, C. J. Rift Valley fever in Rural Northern Senegal: human risk factors and potential vectors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 50, n. 6, p. 663-675, 1994.
- WOODALL, J. P. Virus research in Amazonia. In: Lent, H. *Atas do Simpósio Sobre a Biota Amazônica*. Rio de Janeiro, 1967. v. 6 (Patologia), p. 31-63.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases*. Geneva, 1985. (Technical Report-Series, 719).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control*. 2. ed. Geneva, 1997. p. 9-11.

ANEXO 1 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o experimento utilizaram-se onze cubas de vidro com capacidade para 200ml, provetas de vidro com capacidade para 1000ml, 500ml e 250ml, pipetas de vidro de 5ml e 10ml, dois beaker graduados para 1000ml e 2000ml, recipiente de vidro com capacidade para 10.000ml, berço com capacidade para 25 lâminas, micropipetas (1-10 μ , 20-200 μ l, 200-1000 μ l), ponteira para micropipetas, lâminas Super Frost®/Plus, câmara úmida, câmara escura, estufa graduada a 60°C, pH metro, relógio digital de tempo, balança de precisão aferindo até 0,01g, microscópio óptico com objetivas de 4x, 10x e 40x.

Soluções

Solução de formalina neutra tampão a 10%

Formaldeído 37% – 40%.....	100,0ml
Água destilada	900,0ml
Fosfato de sódio monobásico	4,0 g
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	6,0 g

Solução fosfatada tampão (PBS)

(0,01 M, ph 7.4)

Fosfato monobásico de Sódio	4,86 g
Fosfato dibásico de Sódio (anidro)	27,31 g
Cloreto de Sódio.....	160,00 g
Água destilada q.s.p.	1,00 l

Hematoxilina de Mayer

Hematoxilina cristal	1,0 g
Água destilada	1.000,0 ml
Iodato de sódio	0,2 g
Alúmen de potássio	50,0 g
Ácido cítrico	1,0 g
Hidrato de cloral	50,0 g

Dissolver o alúmen na água morna, acrescentar e dissolver a hematoxilina nesta solução. Então acrescentar o iodato de sódio, ácido cítrico e o hidrato cloral. Misturar e depois adicionar cada componente. Coloração final vermelho-violeta. Aguardar duas semanas antes do uso.

ANEXO 2 - PROTOCOLO DE PROCEDIMENTOS - MÉTODO IMUNO -

HISTOQUÍMICO

(SISTEMA ENVISION - FOSFATASE ALCALINA)

1. Retirar parafina em Xilol I a 60°C e em Xilol II a temperatura ambiente.
2. Hidratar os cortes em álcool na seguinte ordem: álcool absoluto I, II, III, 95% e 80%.
3. Lavagem em água corrente e destilada.
4. Lavar em água corrente e destilada.
5. Lavar em tampão fosfato - salino (PBS) 0,01 M, pH 7,4 em três banhos de cinco minutos cada.
6. Incubar com anticorpo primário ou antissoro específico para o vírus Morumbi, na diluição de 1/4000, 18 horas, overnight a 4°C.
7. Lavar em tampão PBS três vezes por cinco minutos.
8. Aplicar o anticorpo secundário cabra anti-imunoglobulinas de camundongo e cabra anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Dako, USA), incubar a 37°C por 30 minutos.
9. Lavar com tampão PBS, pH 7,4, três banhos por cinco minutos cada.
10. Aplicar duas gotas do substrato específico, Fast Red (Dako, USA) por três minutos em câmara escura a temperatura ambiente (fosfato de naftol, Fast Red).
11. Lavar com água destilada, água corrente e água destilada.
12. Contra - coloração com hematoxilina de Mayer por dois minutos
13. Lavar em água corrente, água amôniaal e água corrente
14. Desidratar em álcool a 50%, 80%, 95%, absoluto I, II e III.
15. Adicionar o Crystal/Mount (Bimeda ou Fisher Scientific Co) e incubar a 37°C até secar.
16. Montar com uma gota de Entellan (Merck).

ANEXO 3 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO GRUPO INFECTADO POR VIA INTRACEREBRAL

SUB GRUPOS	Área Portal						Lóbulo								
	E	II	DV	LA	HD	C	Hepatócito			Outros					
							T	MG	CA	R	II	DVH	DS	HCK	C
IC. 24. 1	1	2	2	0	0	0	2	1	0	1	1	1	0	S	0
IC. 24. 2	1	1	2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	S	0
IC. 24. 3	1	1	2	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	S	0
IC. 24. 4	1	1	2	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	S	0
IC. 24. 5	1	1	2	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	S	0
IC. 24. 6	1	1	2	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	S	0
IC. 48. 1	1	2	3	0	0	0	1	1	2	0	2	2	0	S	0
IC. 48. 2	1	2	2	0	0	0	3	1	2	0	2	2	1	S	0
IC. 48. 3	1	1	2	0	0	0	1	1	1	0	2	1	0	S	0
IC. 48. 4	1	2	3	0	0	0	1	0	2	0	2	2	1	S	0
IC. 48. 5	1	2	2	0	0	0	3	1	2	0	2	1	1	S	1
IC. 48. 6	1	1	2	0	0	0	3	2	2	0	2	2	2	S	0
IC. 72. 1	0	1	1	0	0	0	2	0	2	1	2	3	2	S	0
IC. 72. 2	0	1	1	0	0	0	2	0	2	1	2	1	2	S	0
IC. 72. 3	1	1	2	0	0	0	2	0	2	1	1	2	1	S	0
IC. 72. 4	1	0	2	0	0	0	2	0	2	1	2	2	1	S	0
IC. 72. 5	0	1	1	0	0	0	1	1	2	1	2	1	2	S	0
IC. 72. 6	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	1	3	1	S	1
IC. 96. 1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	S	1
IC. 96. 2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	S	0
IC. 96. 3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	1	S	0

Legenda:
E - Edema
II - Infiltrado inflamatório
DV - Dilatação de vênula
LA - Lesão arteriolar
Nº em negrito - Moda

HD - Hiperplasia de ducto biliar
T - Tumefação
MG - Metamorfose gordurosa
CA - Corpúsculo acidófilo

R - Regeneração
DVH - Dilatação de vênula hepática
DS - Dilatação de sinusóide
HCK - Hiperplasia de células de Kupffer

C - Colestase
S - Sim
N - Não

FONTE: Dados primários

ANEXO 4 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA NO GRUPO INFECTADO POR VIA INTRAPERITONEAL

SUB GRUPOS	Área Portal						Lóbulo								
	E	II	DV	LA	HD	C	Hepatócito				Outros				
							T	MG	CA	R	II	DVH	DS	HCK	C
IP. 24. 1	2	1	1	0	0	0	2	3	1	0	1	1	0	S	0
IP. 24. 2	2	2	1	0	0	0	1	3	1	0	1	1	0	S	0
IP. 24. 3	2	2	1	0	0	0	2	1	1	1	1	1	0	S	0
IP. 24. 4	1	1	1	0	0	0	2	1	1	0	1	1	0	S	0
IP. 24. 5	1	1	1	0	0	0	1	2	1	1	1	0	0	S	0
IP. 24. 6	2	1	1	0	0	0	2	3	0	0	1	1	0	S	0
IP. 48. 1	1	2	1	0	0	0	3	1	2	1	2	2	1	S	0
IP. 48. 2	1	2	2	0	0	0	1	0	2	1	2	1	1	S	0
IP. 48. 3	1	2	1	0	0	0	2	0	2	0	2	2	1	S	0
IP. 48. 4	1	2	2	0	0	0	3	0	2	1	2	2	1	S	0
IP. 48. 5	1	2	1	0	0	0	3	0	2	1	2	1	1	S	0
IP. 48. 6	1	1	2	0	0	0	1	0	2	0	2	2	2	S	0
IP. 72. 1	0	2	2	0	0	0	0	0	3	0	3	2	3	S	0
IP. 72. 2	0	2	2	0	0	0	0	0	3	0	3	2	2	S	0
IP. 72. 3	2	1	2	0	0	0	0	0	3	1	3	2	2	S	0
IP. 72. 4	1	1	2	0	0	0	1	0	3	0	3	2	3	S	0
IP. 72. 5	1	1	2	0	0	0	2	1	3	1	3	2	2	S	0
IP. 72. 6	0	1	1	0	0	0	1	0	2	2	2	1	2	S	0
IP. 96. 1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	S	0
IP. 96. 2	0	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	S	0
IP. 96. 3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	S	0

Legenda:
E - Edema
II - Infiltrado inflamatório
DV - Dilatação de vênula
LA - Lesão arteriolar
Nº em negrito - Moda

HD - Hiperplasia de ducto biliar
T - Tumefação
MG - Metamorfose gordurosa
CA - Corpúsculo acidófilo

R - Regeneração
DVH - Dilatação de vênula hepática
DS - Dilatação de sinusóide
HCK - Hiperplasia de células de Kupffer

C - Colestase
S - Sim
N - Não

FONTE: Dados primários

ANEXO 5 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA NO GRUPO INFECTADO POR VIA SUBCUTÂNEA

SUB GRUPOS	Área Portal						Lóbulo									
	E	II	DV	LA	HD	C	Hepatócito				Outros					
							T	MG	CA	R	II	DVH	DS	HCK	C	
SC. 24. 1	1	1	1	0	0	0	3	1	1	0	0	1	0	S	0	
SC. 24. 2	1	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	S	0	
SC. 24. 3	1	1	1	0	0	0	3	0	0	0	1	1	0	S	1	
SC. 24. 4	1	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	S	1	
SC. 24. 5	1	1	1	0	0	0	3	3	1	1	0	1	0	S	1	
SC. 24. 6	1	1	1	0	0	0	2	1	1	0	0	1	0	S	1	
SC. 48. 1	2	2	2	0	0	0	2	1	2	2	2	2	2	S	0	
SC. 48. 2	2	2	2	0	0	0	2	1	2	1	2	2	1	S	0	
SC. 48. 3	2	2	1	0	0	0	3	1	1	0	1	1	1	S	0	
SC. 48. 4	1	1	1	0	0	0	2	3	1	1	2	1	1	S	0	
SC. 48. 5	1	2	2	0	0	0	1	1	2	0	2	2	2	S	0	
SC. 48. 6	1	2	2	0	0	0	1	1	2	1	2	2	2	S	0	
SC. 72. 1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	S	0	
SC. 72. 2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	N	0	
SC. 72. 3	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	2	2	2	S	0	
SC. 72. 4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	S	0	
SC. 72. 5	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	S	0	
SC. 72. 6	0	1	1	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	S	0	
SC. 96. 1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	2	1	1	1	S	0	
SC. 96. 2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	1	1	1	S	0	
SC. 96. 3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	N	0	
SC. 96. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	N	0	
SC. 96. 5	0	1	1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1	S	0	
SC. 96. 6	0	1	1	0	0	0	0	0	1	3	1	1	1	S	0	
SC. 120. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	N	0	
SC. 120. 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	N	0	
SC. 120. 3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	1	2	S	0	
SC. 120. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	2	S	0	
SC. 120. 5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	1	1	S	0	

Legenda:

E - Edema

II - Infiltrado inflamatório

DV - Dilatação de vênula

LA - Lesão arteriolar

Nº em negrito - Moda

HD - Hiperplasia de ducto biliar

T - Tumefação

MG - Metamorfose gordurosa

CA - Corpúsculo acidófilo

R - Regeneração

DVH - Dilatação de vênula hepática

DS - Dilatação de sinusóide

HCK - Hiperplasia de células de Kupffer

C - Colestase

S - Sim

N - Não

FONTE: Dados primários

ANEXO 6 – DISTRIBUIÇÃO DO ANTÍGENO NO GRUPO INFECTADO POR VIA INTRACEREBRAL

SUB GRUPOS	Geral					Específica									
	G	P	PP	ML	CL	Espaços porta					Lóbulos				
						V	A	DB	I	M	HI	HN	CK	LS	VH
IC. 24. 1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
IC. 24. 2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
IC. 24. 3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
IC. 24. 4	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
IC. 24. 5	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
IC. 24. 6	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
IC. 48. 1	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	2	1	1	0	1
IC. 48. 2	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	2	2	1	0	1
IC. 48. 3	2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	2	2	1	0	1
IC. 48. 4	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0	2	2	1	0	1
IC. 48. 5	2	0	1	2	2	2	0	0	0	0	2	2	1	0	1
IC. 48. 6	2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	2	2	1	0	2
IC. 72. 1	1	0	1	2	2	1	0	0	0	0	2	2	2	1	1
IC. 72. 2	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0
IC. 72. 3	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0
IC. 72. 4	2	0	1	2	2	1	0	0	0	0	1	2	2	0	2
IC. 72. 5	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	2	2	2	1	0
IC. 72. 6	2	0	1	2	1	2	0	0	0	0	2	2	2	2	1
IC. 96. 1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
IC. 96. 2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
IC. 96. 3	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	2	1	0	0

Legenda:

G - Global

P - Portal

PP - Periportal

ML - Médio lobular

CL - Centro lobular

V - Veia

A - Arteríolar

DB - Ducto biliar

I - Interstício

M - Macrófago

HI - Hepatócitos integros

HN - Hepatócitos necrosados

CK - Células de kupffer

LS - Livre nos sinusóides

VH - Vênula hepática

Nº em negrito - Moda

FONTE: Dados primários

ANEXO 7 – DISTRIBUIÇÃO DO ANTÍGENO NO GRUPO INFECTADO POR VIA
INTRAPERITONEAL

SUB GRUPOS	Geral					Específica									
	G	P	PP	ML	CL	Espaços porta						Lóbulos			
						V	A	DB	I	M	HI	HN	CK	LS	VH
IP. 24. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP. 24. 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP. 24. 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP. 24. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP. 24. 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP. 24. 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IP. 48. 1	2	0	1	2	1	2	0	0	0	0	1	2	2	0	1
IP. 48. 2	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	2	1	0	1
IP. 48. 3	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	2	1	0	1
IP. 48. 4	2	0	1	2	2	1	0	0	0	0	1	2	1	0	1
IP. 48. 5	2	0	1	2	1	2	0	0	0	0	1	2	2	0	1
IP. 48. 6	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1
IP. 72. 1	2	0	2	2	2	1	0	0	0	0	2	2	3	0	1
IP. 72. 2	2	0	1	2	2	1	0	0	0	0	1	2	3	0	0
IP. 72. 3	3	0	2	3	3	1	0	0	0	0	2	3	3	0	1
IP. 72. 4	3	0	2	3	3	1	0	0	0	0	2	3	3	0	1
IP. 72. 5	3	0	2	3	3	1	0	0	0	0	2	3	2	0	1
IP. 72. 6	3	0	2	3	3	1	0	0	0	0	2	3	3	0	1
IP. 96. 1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1
IP. 96. 2	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	2	2	0	1
IP. 96. 3	2	0	2	2	1	1	0	0	0	0	1	2	2	0	1

Legenda:

G - Global
P - Portal
PP - Periportal
ML - Médio lobular
CL - Centro lobular

V - Veia
A - Arteríolar
DB - Ducto biliar
I - Interstício
M - Macrófago

HI - Hepatócitos íntegros
HN - Hepatócitos necrosados
CK - Células de kupffer
LS - Livre nos sinusóides
VH - Vênula hepática

Nº em negrito - Moda

FONTE: Dados primários

ANEXO 8 – DISTRIBUIÇÃO DO ANTÍGENO NO GRUPO INFECTADO POR VIA SUBCUTÂNEA

SUB GRUPOS	Geral					Específica										
	G	P	PP	ML	CL	Espaços porta						Lóbulos				
						V	A	DB	I	M	HI	HN	CK	LS	VH	
SC. 24. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 24. 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 24. 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 24. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 24. 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 24. 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 48. 1	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	1
SC. 48. 2	2	0	2	2	1	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	1
SC. 48. 3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
SC. 48. 4	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
SC. 48. 5	2	0	0	2	1	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	1
SC. 48. 6	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	2	1	0	0	1
SC. 72. 1	2	0	2	1	1	1	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1
SC. 72. 2	2	0	1	2	2	1	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1
SC. 72. 3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 72. 4	2	0	2	1	1	1	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1
SC. 72. 5	2	0	2	2	2	1	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1
SC. 72. 6	2	0	2	2	1	1	0	0	0	0	1	2	2	0	0	1
SC. 96. 1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
SC. 96. 2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
SC. 96. 3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SC. 96. 4	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
SC. 96. 5	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
SC. 96. 6	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
SC. 120. 1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
SC. 120. 2	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1
SC. 120. 3	2	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1
SC. 120. 4	2	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1
SC. 120. 5	2	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	1

Legenda:

G - Global
P - Portal
PP - Periportal
ML - Médio lobular
CL - Centro lobular

V - Veia
A - Arteríolar
DB - Ducto biliar
I - Interstício
M - Macrófago

HI - Hepatócitos íntegros
HN - Hepatócitos necrosados
CK - Células de kupffer
LS - Livre nos sinusóides
VH - Vênula hepática

Nº em negrito - Moda

FONTE: Dados primários

