

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Rafael Elias Marques

**Encefalite de Saint Louis: caracterização dos papéis dos Interferons
em um modelo de infecção em camundongos**

Belo Horizonte

2016

Rafael Elias Marques

**Encefalite de Saint Louis: caracterização dos papéis dos Interferons
em um modelo de infecção em camundongos**

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para defesa de tese de doutoramento.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Belo Horizonte

2016

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunofarmacologia, sediado no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As dependências do laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, sediado no departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, também foram utilizadas. Este trabalho foi financiado pelas agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e pelo INCT Dengue.

Dedicado a Maíra

“Most people say that it is the intellect which makes a great scientist. They are wrong: it is character”

Albert Einstein

Agradecimentos

Dada a contribuição das pessoas ao desenvolvimento e conclusão desta tese, inicialmente agradeço meu orientador Mauro Teixeira. Obrigado por todos esses anos de convivência enriquecedora, divertida e produtiva. Valorizo o seu estilo de orientação, permeado pela confiança no potencial do aluno, que tenho certeza ter contribuído para que eu me tornasse um pesquisador cada vez mais independente. Observei e vivi o empenho com que você promove novas empreitadas e experiências para seus alunos. Admiro sua inteligência, suas capacidades como cientista e gestor, sua generosidade para com seus colegas e o fato de ser uma pessoa íntegra.

Agradeço a Juliana Del Sarto e Rebeca Rocha pela ajuda inestimável em todo o desenvolvimento técnico do trabalho aqui apresentado. Obrigado por confiarem em mim para supervisioná-las e espero que nossa experiência trabalhando juntos tenha sido tão legal para vocês quanto foi pra mim. Conheço o potencial e inteligência de vocês, desde cedo, e me orgulho em vê-las se construindo como cientistas.

Agradeço o professor Maurício Nogueira, da FAMERP, por ter me cedido o objeto de estudo do meu doutorado, o vírus da Encefalite de St. Louis (SLEV), e por sempre ter incentivado a minha incursão na virologia. Ainda, agradeço a colaboração do Prof. Maurício e do Prof. João Pessoa Araújo Júnior, da UNESP, nos esforços de sequenciamento do genoma da linhagem BeH 355964, algo essencial ao desenvolvimento desta tese.

Agradeço o professor Flávio Amaral pelo apoio e companheirismo, por me ensinar a importância dos alunos sêniores em um laboratório de pesquisa e pelas inúmeras vezes que permitiu o uso de sua sala para que eu escrevesse esta tese. Em especial, gostaria de agradecer-lo por cuidar da manutenção e logística dos nossos animais de laboratório, sem os quais não realizaria este trabalho. Admiro sua dedicação e habilidade no ensino de imunologia.

Agradeço a professora Danielle Souza pelo apoio incondicional nos oito anos que frequentei seu laboratório. Obrigado pelas oportunidades proporcionadas, pelo carinho e pelas inesquecíveis conversas.

Agradeço os demais professores do grupo Imunofarmacologia por contribuições inúmeras e variadas, em especial aos professores Gustavo Menezes, Fabiana Machado e Vanessa Pinho.

Agradeço meu colega de laboratório e amigo, Bráulio Lima, pela amizade e pelas experiências compartilhadas e construídas nesses anos de mestrado e doutorado no Imunofarmacologia. Estendo esse agradecimento aos inúmeros (!) colegas, com os quais mantemos um ambiente incrível de amizade, colaboração, caos criativo e ciência no laboratório. Estes são Thiago (Baiano), Juliana, Pedro Elias, Luciana, Rebeca, Ana Letícia, Nathália, Izabela, Daiane, Livia, Adriano, Bruno, Rodrigo, Rosália, Flávia e demais colegas que se foram ou que estão em trânsito. Agradeço também às colegas visitantes da Nutrição, alunos do Gustavo e do Remo. Por fim, agradeço os alunos do laboratório da Dani, especialmente ao Daniel Cisalpino e ao Fernando Roque (Humberto) pela companhia excepcional, e a Vivian pelo companheirismo no trabalho com flavivirus, desde a época do dengue.

I would like to thank Johan Neyts and Kai Dallmeier for hosting me for a year in the Laboratory of Virology and Chemotherapy of the Rega Institute, in Leuven, Belgium. Thanks for entrusting me with an important part of the DNA-YFVax project and giving me the freedom to participate in other lab projects. I would like to thank Niraj Mishra, Dieudonne Kum, Ruben Pholien, Suzanne Kaptein, Joana Pereira, Carolien De Keizer and many others for sharing their time and expertise. In particular, I would like to thank Joanna Zmurko for introducing me to ZIKV, and for the great times we had while working with zika. I'm pleased to have worked with all of you. I would like to send special thanks to Mareike Grabner and Els Scheers for their friendship in and out of the lab, and for being amazing. Thanks to Marjorie at the Hond for providing me with the best cappuccino a PhD student can ask for. I miss you all!

Agradeço a Ilma pela coordenação dos insumos e funcionalidade do laboratório de Imunofarmacologia, funções desempenhadas com desenvoltura e organização impressionantes. Obrigado por toda a ajuda em meio ao caos. Estendo os agradecimentos a Gilvânia e a Frank, que também contribuem ao bom funcionamento dos laboratórios.

Agradeço o Prof. Ronaldo Thomasini pelo companheirismo no desenvolvimento do projeto Encefalites, e especialmente pela ajuda e orientação no estabelecimento da reação de RT-qPCR para SLEV utilizada nesta tese.

Agradeço o Alysson Cramer e Fátima Brant, ambos do laboratório da Profa. Fabiana pela ajuda com as culturas primárias de glia de camundongos.

Agradeço o Giovanni Gomes, da UFPA, e a Profa. Milene Rachid da UFMG pela ajuda com as técnicas histológicas de cérebro.

Agradeço os técnicos bioteristas pelos cuidados dedicados aos animais de laboratório utilizados nesse estudo.

Agradeço ao Rodrigo, pelo apoio distante, mas presente. Apoio que é essencial, que resenha, que tenta ser amigo com ar de aviário, que fala com muitas palavras o que pode ser dito com poucas, que me ensina, mas não pimpa, que me diverte e que me lembra de tempos que hoje são diferentes, mas que não chegam a ser *strikingly different*. Agradeço também o professor Caio Fagundes pelas discussões intrigantes e o professor Remo pela utilização de seu laboratório.

Agradeço os professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia pelo apoio, alguns desde a graduação, dentre os quais ressalto João Marques, Leda Vieira, Helton Santiago, Jader Cruz, Santuza Teixeira, Alfredo Góes e Carlos Renato Machado por suas contribuições a nível pessoal e profissional.

Agradeço a Tânia, Orlando e demais secretários do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela valiosa ajuda com os aspectos burocráticos da vida acadêmica.

Agradeço a Ilda e Ilma pela organização da pausa do café, ponto de encontro essencial à manutenção da sanidade no dia-a-dia.

Agradeço meus amigos da Biologia pela amizade e bom humor em meio à complexidade e desespero da vida acadêmica/ vida adulta, seja ela feita com sapinhos, com mato, com “farmáco” ou com coisas que não existem. Nomes a serem citados aqui são: Pomarola, Ruiz, João, Lélis, Goiás, Pedrão, Eudes, Xexéu, o Amiguiu e velhos conhecidos do DA Biologia.

Agradeço meus amigos do Coréu: Tiona, Gut, Janaína, Thiago, João, Henrique, Jeanine e Bruno por décadas de amizade e diversão.

Agradeço minha esposa, Maíra, pelo apoio incondicional ao desenvolvimento da minha carreira como cientista e pela felicidade nesta vida que estamos construindo juntos. Meus carinhos à Canhota pelo amor canino sem igual. Agradeço meus pais, Roberto e Solange, meus

irmãos Pedro e Frederico e as respectivas Rafaela e Bruna. Obrigado por todo apoio, amor e felicidade. Agradeço também à família em Porto Alegre, que me acolheu de forma maravilhosa, e aos demais parentes que sempre me apoiaram na carreira científica.

Sumário

Lista de abreviaturas	11
Lista de figuras.....	13
Resumo	15
Abstract.....	16
1. Introdução.....	17
1.1. A encefalite de St. Louis	17
1.2. A resposta imune ao SLEV e a outros flavivirus	21
1.3. Os Interferons (IFNs) – função antiviral e mecanismos associados	24
2. Objetivos.....	28
3. Metodologia.....	29
3.1. Animais	29
3.2. Vírus.....	29
3.3. Segurança Biológica.....	29
3.4. Padronização da infecção em camundongos.....	30
3.5. Quantificação de carga viral.....	30
3.6. Quantificação de citocinas	31
3.7. Detecção indireta de leucócitos.....	32
3.8. Análise Hematológica	32
3.9. Citometria de fluxo.....	33
3.10. Análise histológica	33
3.11. Experimentos comportamentais	34
3.12. Análises estatísticas	35
4. Resultados.....	36
4.1. Padronização do modelo murino de encefalite de St. Louis	36
4.1.1. Sequenciamento completo do genoma de SLEV BeH 355964	36
4.1.2. A inoculação de SLEV pela via intracranial causa mortalidade em camundongos	38
4.1.3. A mortalidade causada pelo SLEV em camundongos é associada ao desenvolvimento de encefalite.....	40
4.1.4. A infecção por SLEV causa dano tecidual no sistema nervoso central e resulta em alterações comportamentais.....	46
4.2. Estudo dos papéis dos IFNs no modelo murino de encefalite de St. Louis – IFNs do tipo I	52

4.2.1.	IFNs do tipo I e tipo II possuem papéis distintos na infecção experimental pelo SLEV	52
4.2.2.	IFNs do tipo I estão envolvidos no controle da replicação de SLEV	53
4.2.3.	A replicação acelerada de SLEV leva a produção precoce de citocinas no cérebro de camundongos ABR ^{-/-} , mas não afeta outros parâmetros inflamatórios da doença	54
4.2.4.	Camundongos ABR ^{-/-} possuem alterações na atividade microglial e na ativação de caspase 3 na infecção por SLEV	58
4.2.5.	O aumento da replicação de SLEV em camundongos ABR ^{-/-} está relacionado à baixa expressão de ISGs	61
4.3.	Estudo dos papéis dos IFNs no modelo murino de encefalite de St. Louis – IFNs do tipo II	64
4.3.1.	Camundongos IFN γ ^{-/-} possuem carga viral reduzida no cérebro em comparação a camundongos WT, porém não apresentam redução na produção de citocinas	64
4.3.2.	Camundongos IFN γ ^{-/-} apresentam recrutamento de macrófagos/micróglia ao cérebro infectado	66
4.3.3.	Camundongos IFN γ ^{-/-} apresentam expressão alterada de ISGs no pico da infecção por SLEV	68
4.4.	SLEV induz a expressão de IFNs do tipo III exclusivamente no cérebro de camundongos IFN γ ^{-/-}	70
5.	Discussão	72
6.	Conclusões e perspectivas	83
7.	Bibliografia	85
8.	Anexos	93
8.1.	Anexo 1	93
8.2.	Anexo 2	94
8.3.	Anexo 3	95
8.4.	Anexo 4	96

Lista de abreviaturas

Aa - aminoácido

ABR^{-/-} - camundongo SV129 deficiente nos receptores para interferons do tipo I

C57BL/6, Balb/c, SV129 – linhagens de camundongos

CCL5 – *C-C chemokine ligand 5*, quimiocina C-C ligante 5

CDn – *Cluster of differentiation n*,

CNS – Sistema nervoso central

CXCL1 – *C-X-C chemokine ligand 1*, quimiocina C-X-C ligante 1

DENV – vírus da dengue

EPO – peroxidase eosinofílica

H&E – Hematoxilina e Eosina

ICB/UFMG – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

i.c. – via intracranial

IFN – Interferon

IFNAR1, 2 – receptor para interferons do tipo I

IFNLR - receptor para Interferons lambda

IFN γ ^{-/-} - camundongo C57BL/6 deficiente em Interferon γ

IL-n – Interleucina – n

i.p. – via intraperitoneal

ISG – genes estimulados por IFN

JEV – vírus da encefalite japonesa

m/v – massa por volume

MOCK – injetado com salina

MPO - mieloperoxidase

NAG – n-acetil-glucosaminidase

NI – não infectado, não inoculado

OAS - 2'-5' oligoadenilato sintetase

OASL2 – gene tipo 2'-5' oligoadenilato sintetase 2

PFU – unidades formadoras de placas de lise (vírus)

p.i. – pós-infecção

PRR – receptor de padrão molecular

RIG-I – gene induzido por ácido retinóico 1

RNAseL – ribonuclease L

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR – *Reverse Transcriptase quantitative PCR*, PCR quantitativa após transcrição reversa

SHIRPA – bateria de testes para avaliação comportamental de camundongos

SmithKline/Harwell/ Imperial College/ Royal Hospital/ Phenotype Assessment

SLEV – vírus da encefalite de St. Louis

St - Saint

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

WNV – vírus do oeste do Nilo

WT – camundongo do tipo selvagem

YFV – vírus da febre amarela

ZIKV – vírus da Zika

Lista de figuras

Figura 1 - Distribuição mundial de encefalites causadas pelo SLEV e por flavivirus relacionados.	17
Figura 2 - Paciente acometido pela encefalite de St. Louis.	19
Figura 3 - A ativação da via dos IFNs pela detecção citoplasmática de dsRNA e virus	25
Figura 4 - Ligação dos IFNs tipo I, tipo II e tipo III aos seus respectivos receptores e mecanismo de ação	26
Figura 5 - Caracterização de SLEV BeH 355964 e padronização de técnicas de estudo do virus	37
Figura 6 - A inoculação de SLEV pela via intracranial causa mortalidade em camundongos.	38
Figura 7 - Camundongos das linhagens C57BL/6 e SV129 apresentam diferentes susceptibilidades à infecção pelo SLEV.	39
Figura 8 - SLEV se replica no cérebro de camundongos e induz a produção local de citocinas pró-inflamatórias.	41
Figura 9 - SLEV induz a expressão de IFNs do tipo I no cérebro de camundongos	42
Figura 10 - A infecção por SLEV causa leucopenia caracterizada por linfopenia em camundongos, e leva ao recrutamento de granulócitos ao cérebro	44
Figura 11 - Neutrófilos, linfócitos T e células NK são recrutados ao cérebro de camundongos infectados por SLEV.	45
Figura 12 - A infecção por SLEV causa dano tecidual no cérebro de camundongos, com meningite e perda neuronal no hipocampo.	47
Figura 13 - Alterações histopatológicas nos cérebros de camundongos acometidos pela encefalite de St. Louis experimental se estendem às meninges, cérebro, hipocampo e tronco cerebral.	49
Figura 14 - A infecção experimental por SLEV causa reduções nas funções sensoriais, reflexas e neuropsiquiátricas em camundongos.	50
Figura 15 - Camundongos que sobrevivem à infecção pelo SLEV apresentam atividade locomotora espontânea reduzida.	51
Figura 16 - IFNs tipo I e tipo II possuem papéis distintos na infecção experimental pelo SLEV	53
Figura 17 - IFNs do tipo I são importantes para o controle da replicação de SLEV <i>in vivo</i>	54
Figura 18 - A infecção por SLEV causa a expressão antecipada de citocinas no cérebro de animais ABR.	55
Figura 19 - Camundongos WT e ABR ^{-/-} infectados com SLEV apresentam o mesmo grau de lesão tecidual no cérebro ao terceiro dia p.i.	57
Figura 20 - A infecção por SLEV causa alteração da morfologia microglial.	59
Figura 21 - A infecção por SLEV causa a ativação acelerada de caspase-3 no cérebro de camundongos ABR ^{-/-}	60
Figura 22 - O aumento da replicação de SLEV está relacionado à baixa expressão de ISGs em camundongos ABR ^{-/-}	62
Figura 23 - Camundongos IFN γ ^{-/-} acumulam menos vírus no cérebro ao longo da infecção pelo SLEV, mas não apresentam mudanças na produção de citocinas pró-inflamatórias.	65
Figura 24 - Camundongos IFN γ ^{-/-} infectados apresentam recrutamento de macrófagos/microglia ao cérebro	67

Figura 25 - Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ apresentam expressão basal de RIG-I aumentada no cérebro, que é mantida na infecção pelo SLEV	69
Figura 26 - SLEV induz a expressão de IFNs do tipo III exclusivamente no cérebro de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$	70

Resumo

As últimas décadas foram marcadas pela emergência e reemergência de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* no Brasil e no mundo. Este gênero inclui vírus capazes de causar encefalite, uma manifestação grave que pode levar ao óbito ou a sequelas neurológicas, dentre os quais há o vírus da encefalite de Saint (St.) Louis (SLEV). A patogênese da encefalite de St. Louis é pouco compreendida, o que prejudica o desenvolvimento de tratamentos específicos e vacinas, uma limitação em comum com outros flavivírus como o vírus Zika e o vírus da dengue. Para tal, desenvolvemos um modelo animal de infecção pelo SLEV em camundongos a fim de investigar mecanismos envolvidos na resistência à infecção e doença. O modelo animal é baseado na inoculação da linhagem BeH 355964, um SLEV isolado de uma paciente no Brasil, que quando inoculado pela via intracranial (i.c) causa a morte de camundongos. Esse fenômeno é acompanhado de replicação viral, inflamação e dano tecidual no cérebro, caracterizando encefalite. A associação da replicação viral com mortalidade pós-infecção nos levou ao estudo dos interferons (IFNs), que são tradicionalmente associados ao controle de infecções virais. De forma inesperada, a infecção de camundongos deficientes no receptor de IFN do tipo I ($ABR^{-/-}$) ou deficientes para IFN do tipo II ($IFN\gamma^{-/-}$) resultou em fenótipos distintos. Camundongos $ABR^{-/-}$ são muito susceptíveis à infecção, enquanto camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ são moderadamente resistentes. A investigação dos parâmetros de doença indicou que IFNs do tipo I são essenciais para o controle da replicação de SLEV ao induzir a expressão de ISGs, dentre os quais RIG-I, uma molécula associada às respostas imunes inatas contra vírus de RNA. Em contrapartida, a ausência de $IFN\gamma$ em camundongos resultou na redução da replicação viral no cérebro, em associação a uma expressão alterada de ISGs. Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ possuem uma alta expressão de RIG-I no cérebro em condições basais, que indicando que RIG-I pode estar relacionado ao controle da replicação de SLEV. A infecção por SLEV induziu a expressão de INF tipo III somente nos cérebros de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$, indicando IFNs tipo II e III interagem de maneiras ainda desconhecidas no contexto de infecção. Por fim, concluímos que o modelo de infecção por SLEV é uma ferramenta útil para o estudo da encefalite de St. Louis. Ainda, este modelo pode contribuir para a geração de conhecimento aplicável, tais como o delineamento de respostas antivirais no cérebro, aplicável para infecções por SLEV e outros flavivírus, como Zika.

Abstract

Flaviviruses are a genre of closely-related viral pathogens, which emerged or reemerged in the last decades in Brazil and in the world. Flaviviruses such as St. Louis encephalitis virus (SLEV) can cause encephalitis, a severe disease that may lead to death or neurological sequelae. St. Louis encephalitis pathogenesis is poorly understood, which delays the development of a specific treatment or vaccine, in similar way to Zika and Dengue. To address this problem, we developed a mice model of SLEV infection to study mechanisms involved in resistance to infection and disease. The model consists in the intracranial (i.c.) inoculation of the SLEV strain BeH 355964 in mice, a strain isolated from a human patient in Brazil. Inoculated mice die from infection, presenting with SLEV replication, inflammation and brain damage, which are consistent with encephalitis. The correlation of SLEV replication and mortality after infection brought us to the study of IFNs, which are typically associated to the control of viral replication. We infected $ABR^{-/-}$ and $IFN\gamma^{-/-}$ mice, which lack type I IFN receptors or lack type II IFN, respectively, to find that $ABR^{-/-}$ mice are very susceptible to infection, in contrast to $IFN\gamma^{-/-}$ mice, which are slightly resistant. Further study of disease parameters showed that type I IFNs are essential for the control of SLEV replication, through the increase of ISG expression in the brain, notably RIG-I. RIG-I is a molecule known to participate in innate immune responses to RNA viruses. In contrast, absence of $IFN\gamma$ (type II IFN) resulted in the reduction of viral load in the brain, due to high basal levels of RIG-I expression presented by $IFN\gamma^{-/-}$ mice in the brain. SLEV caused the expression of type III IFN only in the brains of $IFN\gamma^{-/-}$ mice, indicating that IFN type II and III interact in ways that are not yet understood, in the context of infection. We conclude that our SLEV infection model is a useful tool for the study of St. Louis encephalitis. This infection model allows for the study of mechanisms of disease pathogenesis and or resistance, such as antiviral responses against a flavivirus in the brain. Thus, this animal model will help to generate applicable knowledge to St. Louis encephalitis and to related flaviviral diseases, such as Zika.

1. Introdução

1.1. A encefalite de St. Louis

O vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) é responsável pela ocorrência de encefalites humanas e veterinárias em áreas urbanas e rurais do hemisfério ocidental. Atualmente, o SLEV está presente em toda a extensão das Américas, com casos de encefalite diagnosticados desde o sul do Canadá à Argentina [1, 2], incluindo o Brasil [3-5] (Figura 1). Epidemias de encefalite de St. Louis ocorrem em intervalos de 5 a 15 anos, nas quais a incidência chega a 800 casos por 100.000 habitantes [6].

O SLEV é classificado na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui vários patógenos humanos, como o vírus da Dengue (DENV), o vírus da Febre Amarela (YFV) e o vírus Zika (ZIKV) [7, 8]. No entanto, a infecção por SLEV não causa febre hemorrágica, como observado em infecções por alguns dos flavivirus acima mencionados, mas pode levar ao desenvolvimento de encefalite. Assim, o SLEV se assemelha mais ao vírus da encefalite japonesa (JEV) e ao vírus West Nile (WNV), considerados importantes agentes etiológicos de encefalites em humanos [9, 10]. SLEV e outros flavivirus possuem um genoma de RNA de aproximadamente 11 kilobases que codifica três proteínas estruturais (C, prM, E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Partículas virais são compostas pelo genoma viral e pelas proteínas estruturais, complexadas em uma estrutura icosaédrica de 50nm de diâmetro [11]. O ciclo de vida viral envolve a transmissão do vírus a aves e a outros vertebrados, como equinos [12] e o homem, por mosquitos do gênero *Culex* [13-16].

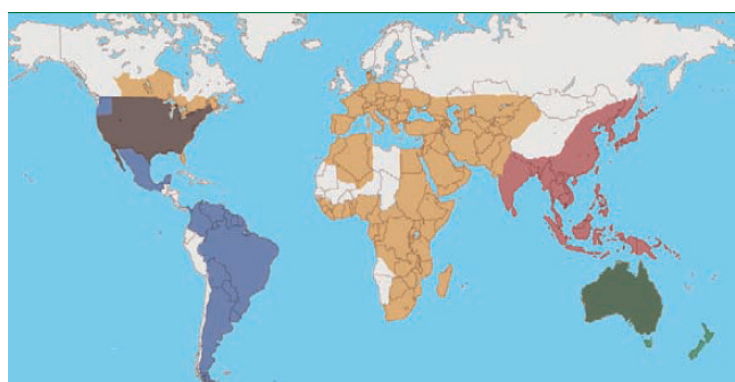


Figura 1 - Distribuição mundial de encefalites causadas pelo SLEV e por flavivirus relacionados.

A encefalite de St. Louis é prevalente nas Américas, marcadas em azul. Adaptado de Ludlam et al [17].

As primeiras epidemias de encefalite atribuídas ao SLEV aconteceram nos Estados Unidos na década de 1930. Até então desconhecido, o agente causador da doença foi isolado e identificado em amostras humanas de cérebro coletadas durante uma epidemia na cidade de St. Louis, onde o vírus causou mais de 1000 casos de encefalite e 197 óbitos. O vírus foi, então, nomeado em função da cidade em que foi descoberto [18-20]. Os pesquisadores envolvidos na identificação do SLEV também concluíram que este não fora responsável pelos vários surtos de encefalite japonesa ocorridos na década de 1920, apesar da grande similaridade antigênica entre SLEV e JEV [21, 22].

Os primeiros relatos da presença de SLEV na América do Sul, especificamente Argentina e Brasil, datam da década de 1960, porém casos de infecção pelo SLEV têm sido identificados esporadicamente na região. Esta discrepância entre a prevalência estimada de SLEV ao longo das Américas é facilmente atribuída à inexistência de políticas de monitoramento do vírus, mas também é atribuída às particularidades que dificultam a identificação de casos de infecção pelo SLEV [2]. Devido à alta similaridade antigênica entre os vírus do gênero *Flavivirus*, infecções são diagnosticadas com dificuldade por meio de técnicas sorológicas, especialmente em pessoas ou animais previamente infectados por um flavivírus [9]. De fato, um surto de infecção pelo SLEV foi detectado em meio a um surto de dengue, no Brasil, confirmando a existência de casos no território brasileiro [23, 24]. Considerando a presença do vetor artrópode e, portanto, a possibilidade de transmissão do vírus, muitas das infecções por SLEV no Brasil podem passar despercebidas ou erroneamente identificadas como dengue ou zika, considerados grandes problemas de saúde pública do Brasil [25-27]. Ainda, estudos realizados na Argentina, em 2005, relataram a circulação de SLEV em mosquitos dois a três anos antes do surgimento de surtos de encefalite de St. Louis. Desde então, já foram notificados quatro surtos de infecção pelo SLEV em diferentes partes da Argentina, reforçando o caráter imprevisível, súbito e alarmante desses fenômenos [28-30].

No âmbito veterinário, pesquisadores da Escola de Veterinária da UFMG, em colaboração com nosso grupo de pesquisa, isolaram e caracterizaram uma linhagem de SLEV de um cavalo com manifestações neurológicas na região de Mariana (MG), enfatizando a circulação do SLEV no Brasil e em diferentes hospedeiros vertebrados [12] (Anexo 3).

Em humanos, infecções por SLEV são majoritariamente assintomáticas [6, 31]. Casos moderados são descritos como um estado febril inespecífico, similar à gripe [19, 32], ou à dengue e zika em suas formas moderadas [33]. Os casos graves ocorrem de forma aguda, sendo que os pacientes podem apresentar cefaleia intensa, náusea, febre, paralisia e rigidez do pescoço e coluna [34]. Casos graves são caracterizados por alterações neurológicas variadas, incluindo perda ou mudança nos reflexos corporais, paralisia flácida, convulsões, sonolência, nistagmo, confusão mental, tremor e, finalmente, presença de encefalite ou meningoencefalite [35-37]. A mortalidade em casos graves pode chegar a 30%. Sobreviventes frequentemente desenvolvem sequelas neurológicas como déficit de memória, irritabilidade, depressão e descoordenação motora, que podem se estender por anos [38-41]. A letalidade pós-infecção ocorre aproximadamente duas semanas após o início dos sintomas e é associada a dano no sistema nervoso central (CNS) [35] (Fig.2).



Figura 2 - Paciente acometido pela encefalite de St. Louis.

Residente da cidade de St. Louis acometido pela epidemia da chamada “doença do sono”, datado de 11 de setembro de 1933. Reproduzido do site da revista TIME, seção Photos throughout TIME, Upi / Corbis-Bettman (<http://content.time.com/time/specials/packages.html>).

Ainda não existe tratamento específico ou vacina para a encefalite de St. Louis [42]. Em 2004, Pugachev e colaboradores desenvolveram um protótipo vacinal para a encefalite de St. Louis, baseada na tecnologia Chimerivax, na qual os genes prM e E de SLEV substituem os genes prM e E no genoma do YF-17D [43]. YF-17D é uma linhagem vacinal de YFV, caracterizada por sua segurança e eficácia em induzir respostas imunes protetoras no hospedeiro, que contribui para o controle da febre amarela mundialmente [44]. O resultado da substituição gênica é a criação de um YFV quimérico que expressa as proteínas estruturais de SLEV, cuja infecção induziria imunidade protetora contra SLEV. Usando as proteínas prM-E de uma linhagem de SLEV isolada na Argentina, os pesquisadores foram capazes de criar um vírus

quimérico atenuado que protege camundongos desafiados com SLEV e que induz anticorpos protetores. Apesar dos resultados promissores como potenciais vacinas, os autores focaram o estudo no uso das quimeras SLEV/YFV como ferramentas de estudo de SLEV, já que podem ser manipulados em condições de biossegurança nível dois, e como ferramentas para diagnóstico clínico de infecções.

A falta de tratamentos específicos para SLEV, e outros flavivirus, se dá principalmente pela necessidade de um maior entendimento sobre patogênese da doença, na qual a resposta imune é considerada como crucial [45]. Encefalite é definida como inflamação no sistema nervoso central, porém existem poucos estudos que descrevam e investiguem aspectos da resposta inflamatória no contexto da infecção pelo SLEV [46-48]. Estudos clínicos ou pós-morte em humanos indicam que a encefalite de St. Louis é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos ao CNS. A técnica de punção lombar é frequentemente empregada para coleta de fluído cérebro espinhal (CSF), que apresenta pleocitose composta em sua maioria por linfócitos e inclui polimorfonucleares [34, 49, 50] em indivíduos infectados. O infiltrado de leucócitos é marcante nas regiões cerebrais do mesencéfalo e ponte [51], e em acúmulos perivasculares disseminados no cérebro [45, 52]. Outro aspecto inflamatório marcante da encefalite de St. Louis é o acometimento da substância nigra, que pode estar relacionado aos sinais clínicos e à patogênese da doença [50, 53]. O desenvolvimento das alterações neurológicas na encefalite de St. Louis (e nas encefalites causadas por outros flavivirus) pode estar relacionada à citotoxicidade causada diretamente pelo vírus; ao dano tecidual associado à resposta imune/inflamação ou ao desequilíbrio da fisiologia cerebral [45, 47, 54]. É possível que a neuropatogênese se origine da combinação de todos esses fatores. Ainda, é necessário considerar a influência de características do vírus, como neurotropismo e neurovirulência [55], e fatores do hospedeiro, como idade avançada [56], que está correlacionada à ocorrência de encefalite após infecção [1, 37, 57].

Atualmente não há um modelo animal da encefalite de St. Louis em uso. A maioria dos estudos realizados em animais é datada das décadas de 1930 a 1960. A utilização de modelos animais de infecção contempla aspectos do hospedeiro e do vírus que permitem um estudo mais abrangente da doença, provendo os conhecimentos necessários para o desenvolvimento e teste de tratamentos específicos e vacinas. Como mencionado anteriormente, um dos aspectos do

hospedeiro a serem estudados na infecção por SLEV é a inflamação. O estudo das respostas inflamatórias associadas à infecção por SLEV necessita de um modelo no qual um mecanismo de patogênese seja definido. Este mecanismo definido de patogênese é o substrato sobre o qual a inflamação pode ser modulada experimentalmente, e os seus efeitos sobre o hospedeiro observados. Esta metodologia permite a identificação de mecanismos de doença e resistência associados à infecção, e a contribuição de aspectos da resposta inflamatória sobre a patogênese da doença. Estudos *in vivo* da infecção pelo SLEV já foram realizados em mosquitos [58-60], aves [61, 62], *hamsters* [63-65], gansos [66], primatas [47] e camundongos [65, 67-71]. Nestes estudos, a doença foi avaliada de forma preliminar, baseada na recuperação de vírus em tecidos de animais infectados, em índices de letalidade e morbidade pós-infecção e ocasionalmente incluíram análises histológicas. Como nos estudos em humanos, aspectos da inflamação e da resposta imune associada à doença foram pouco abordados.

O camundongo é o organismo-modelo mais utilizado para o estudo de encefalites causadas por flavivírus [35, 72]. A utilização de camundongos apresenta vantagens como acessibilidade e abundância de ferramentas experimentais, porém camundongos são pouco susceptíveis à infecção por flavivírus por vias periféricas. Estratégias alternativas, como a utilização de camundongos jovens (1-4 semanas), de camundongos deficientes para genes envolvidos na resposta imune e/ou a inoculação pelas vias intracranial (i.c.) ou intranasal, resulta em infecção e doença comparáveis à apresentada por humanos [35, 73, 74]. Camundongos já foram empregados no isolamento e identificação de vírus, no estudo da virulência de linhagens virais, testes vacinais e de fármacos, determinação de tropismo viral e identificação de fatores que contribuem às doenças causadas por flavivírus [9, 56, 69, 75, 76]. Atualmente, existem modelos experimentais de infecção em camundongos para vários flavivírus (JEV, WNV, YFV, DENV, *Rocio virus*, *Murray Valley encephalitis virus*, *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV)), mas não para SLEV.

1.2. A resposta imune ao SLEV e a outros flavivírus

O sistema imune é tradicionalmente associado à defesa do organismo contra patógenos. Recentemente, evidências apontam para um papel crucial do sistema imune como mantenedor da homeostase do hospedeiro, participando de processos fisiológicos variados. Um fator em comum

dentre as capacidades do sistema imune em defender o hospedeiro de infecções e participar de mecanismos fisiológicos é sua propriedade sensorial, capaz de reconhecer, interpretar e responder aos mais diversos estímulos químicos, físicos e biológicos (Anexo 1). O sucesso de uma resposta imune frente a uma infecção envolve a capacidade sensorial do sistema imune, permitindo a ação coordenada de células e fatores solúveis dos compartimentos inato e adaptativo, a fim de controlar o patógeno e reestabelecer a homeostase. Se a resposta imune falha em controlar o patógeno ou em se controlar, consequências como imunopatogênese podem gerar o agravamento da infecção/ doença [77, 78].

Por se tratar de uma doença transmitida por mosquito, flavivirus entram em contato com células da pele dos vertebrados, especialmente com células de Langerhans [79]. Fagócitos da linhagem mononuclear, como as células de Langerhans, são considerados células-alvo em infecções por flavivirus [80]. Flavivirus se replicam nessas células e em células nos linfonodos drenantes, se disseminam até o sistema nervoso central e atravessam a barreira hematoencefálica (BBB) por mecanismos ainda desconhecidos, onde infectam principalmente neurônios [81]. Em várias fases da infecção, a atuação da resposta imune inata é tida como essencial no controle da replicação viral e desenvolvimento da doença [82]. SLEV, por ser um vírus de RNA, pode ativar os receptores TLR3 e TLR7 em endossomos, e as helicases RIG-I e MDA5 no citoplasma, como já demonstrado para WNV, DENV e JEV [78, 83-85].

RIG-I é uma proteína essencial às respostas de IFNs contra infecções por vírus de RNA [86], incluindo em infecções por flavivirus. O gene que codifica a helicase RIG-I em humanos foi identificado em um estudo *in vitro* utilizando células derivadas de um paciente com leucemia aguda, por um estudante de doutorado na China em 1999. O estímulo dessas células com ácido retinóico, popularmente conhecido como vitamina A, causou o aumento de expressão do gene nomeado e abreviado como RIG-I [87]. RIG-I foi classificado como uma helicase de RNA, e confirmado como uma helicase com domínio DExD/H por outro grupo de pesquisa no ano seguinte [88]. A participação de RIG-I em respostas inatas antivirais, como molécula essencial para o reconhecimento de RNA viral e indutor de respostas de IFN do tipo I, foi descoberta por Yoneyama e colaboradores em 2004 [89]. Pesquisas sobre imunidade inata a flavivirus realizadas desde então demonstram o envolvimento de RIG-I nas respostas antivirais contra todos os flavivirus já testados [90]. RIG-I é importante para o controle da replicação de WNV

[91], JEV [92, 93], TBEV [94], DENV [95] e ZIKV [96] em diferentes tipos celulares, indicando que a ativação de RIG-I é um mecanismo efetor essencial no controle de infecção por flavivirus.

Quando em contato com células do hospedeiro vertebrado, sejam fagócitos, neurônios ou outros tipos celulares, flavivirus interagem com receptores virais e são internalizados por meio de endocitose mediada por receptor [97]. Os receptores virais que se ligam ao SLEV ainda não foram identificados. Após internalização, flavivirus escapam dos endossomos e iniciam sua replicação no citoplasma da célula, por meio da tradução do seu genoma de RNA em proteínas virais estruturais e NS, que realizam a síntese de novas cópias e intermediários de RNA viral, a organização de novas partículas virais e executam mecanismos de evasão da resposta imunológica [78, 98]. No processo de entrada e replicação, e apesar da expressão de proteínas NS com propriedades imunomoduladoras, flavivirus podem ativar receptores de padrões moleculares (PRR), dentre os quais helicases de RNA, receptores tipo Toll (TLR) e o complexo do inflamassoma [99, 100]. A ativação desses receptores leva à indução de resposta antiviral, baseada na produção de IFNs do tipo I e citocinas pró-inflamatórias, e no recrutamento e ativação de leucócitos [101, 102]. A exposição de linfócitos e células apresentadoras de antígenos a flavivirus, no contexto de inflamação/ resposta imune inata, propicia o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, caracterizada por atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺, produção de IgM e IgG e polarização T_h1 [103].

De fato, infecções agudas por flavivirus são tipicamente identificadas pela presença de IgM contra o vírus. No caso de infecção com flavivirus que causam encefalite, pleocitose e a presença de IgM no CSF de pacientes infectados são considerados marcadores de doença neuroinvasiva [104]. O estabelecimento de populações de linfócitos de memória e a presença de anticorpos neutralizantes contra um determinado flavivirus caracteriza o estabelecimento de imunidade adaptativa, que pode proteger indivíduos por toda a vida. Proteção contra infecções por determinados flavivirus podem ser alcançadas após infecção ou após vacinação, por exemplo com a vacina viva atenuada para febre amarela baseada na linhagem YF17D [105].

Vacinas de vírus vivo atenuado, como as vacinas contra febre amarela (YF17D) e encefalite japonesa (SA14-14-2), são extremamente eficazes porque causam uma infecção aguda, porém não patogênica no hospedeiro vertebrado. A infecção resulta na geração de populações de

linfócitos T CD8⁺ específicos aos antígenos virais, resulta em respostas de linfócitos TCD4⁺ balanceadas entre os perfis T_h1 e T_h2 e na geração de elevados títulos de anticorpos neutralizantes que permanecem em circulação por décadas [106, 107]. Outros aspectos da resposta imune à infecção vacinal, como a resposta de células NK, a ativação de PRRs como RIG-I e a expressão de citocinas e IFNs também estão associados à capacidade do hospedeiro em desenvolver imunidade protetora [108].

1.3. Os Interferons (IFNs) – função antiviral e mecanismos associados

IFNs compõem uma família de proteínas caracterizadas (e nomeadas) em função de sua capacidade em “interferir” com o ciclo de vida viral [109]. IFNs são proteínas secretadas que possuem ação autócrina e parácrina, capazes de estimular redes intra e intercelulares de resistência às infecções virais, de potencializar respostas imunes inatas e adaptativas e de modular a sobrevivência celular [110]. A produção de IFNs requer estímulo infeccioso, produtos microbianos ou indução química. Estudos iniciais sobre a biologia dos IFNs identificaram RNA dupla fita (dsRNA) como um potente indutor da expressão de IFNs, que inclusive é produzido no contexto da infecção por flavivirus [111, 112]. A ativação de PRRs, como TLR3 e RIG-I, levam à ativação de moléculas adaptadoras, respectivamente TRIF e IPS-1, que conjuntamente recrutam as cinases IKK e TBK1 [113]. Em seguida, essas cinases ativam fatores de transcrição, especialmente IRF-3, IRF-7 e NFκB, que culminam na expressão de IFNs do tipo I [114] (Fig.3).

IFNs do tipo I incluem 17 genes em humanos, dentre os quais IFNβ, IFNω, IFNε, IFNκ e 13 diferentes genes de IFNα [115]. IFNs do tipo I agem a partir de sua ligação aos receptores IFNAR1 e IFNAR2, que estão acoplados às tirosina-cinases TYK2 e JAK1. Ativação das tirosina-cinases leva à fosforilação de STAT1, STAT2 e IRF9. É importante mencionar que diferentes células possuem diferentes graus de responsividade a IFNs, em parte devido à expressão diferencial de efetores intracelulares, e pelo fato de IFNs modularem a resposta de células à citocinas, e vice versa [116, 117]. A cascata de sinalização de IFNs se finaliza com a expressão de genes induzidos por IFN (ISGs), que medeiam os efeitos biológicos dos IFNs [118] (Fig.4). Mais de 300 ISGs já foram descritos, e seu modo de ação na inibição da replicação viral envolve o controle de mecanismos de expressão proteica, a modulação da estabilidade e edição de RNAs e o controle do transporte e função de proteínas [119]. A ação de ISGs é exemplificada

pelas 2'-5' oligoadenilato sintetases (OAS) e pela ribonuclease L (RNaseL), que inibem a replicação de vários vírus RNA [120], dentre outros exemplos de ISGs. As enzimas OAS sintetizam 2'-5' oligoadenilatos ao serem ativadas por dsRNA. Os oligoadenilatos ativam a RNaseL, que por sua vez cliva RNAs virais e do hospedeiro, interrompendo o ciclo de vida viral e celular. Ainda, a ação da RNaseL gera pequenos fragmentos de RNA que ativam as helicases RIG-I e MDA5, amplificando o mecanismo de ativação de IFNs e a resposta antiviral [121, 122]. Ainda, várias proteínas envolvidas na sinalização e ativação na via dos IFNs se comportam como ISGs, ao serem induzidas de forma autócrina pelos IFNs produzidos por sua ativação, servindo novamente como uma alça de amplificação da resposta à infecção. Dentre essas proteínas estão novamente RIG-I e MDA5, e fatores de transcrição como IRF7 e STAT1 [123].

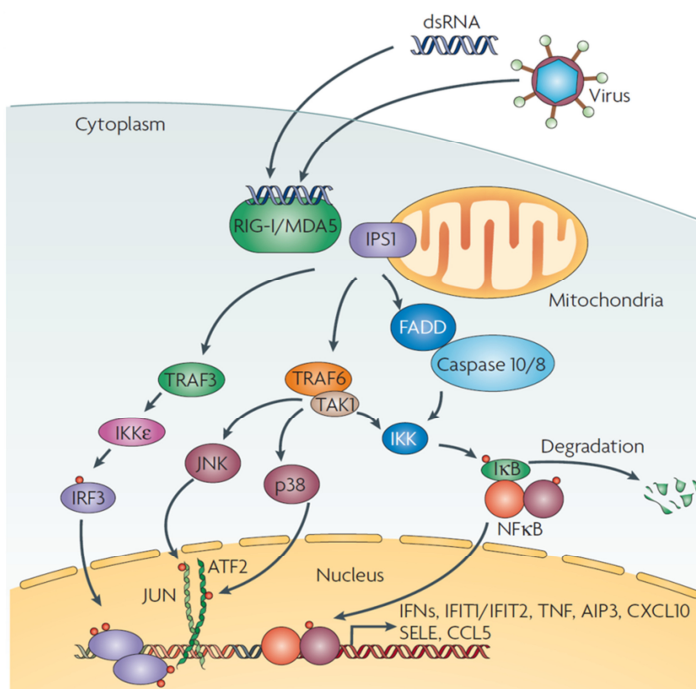


Figura 3 - A ativação da via dos IFNs pela detecção citoplasmática de dsRNA e vírus

dsRNA extracelular ou dsRNA intracelular produzidos durante infecções virais podem ativar as helicases de RNA RIG-I e MDA-5 presentes no citoplasma. Essas moléculas atuam como sensores de RNA, reconhecendo dsRNA ou RNA fita simples (ssRNA) trifosfatado, levando à ativação de IPS-1 associado às mitocôndrias. IPS-1 ativa mecanismos moleculares que resultam na fosforilação de IRF-3 e translocação de JUN, ATF2 e NFκB ao núcleo. A ativação destes fatores de transcrição leva à expressão de IFNs, proteínas IFIT, citocinas e quimiocinas. Ainda, a ativação de IPS-1 leva à apoptose pela ativação de caspases 8 e 10 pela interação com FADD. Adaptado de Borden e colaboradores [110].

De forma geral, os efeitos antivirais diretos consequentes da ativação de PRRs são devidos à expressão de IFNs do tipo I, por exemplo IFN α 4 e IFN β , que por sua vez levam à expressão de ISGs e ao controle da replicação viral. A importância da sinalização de IFNs do tipo I em infecções por flavivirus é evidente, já que a ausência de IFNAR/2 ou de moléculas associadas à transdução de sinal levam ao aumento da replicação viral, da patogênese e mortalidade em diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* [82, 124-126]. Ainda, Brooks e Phillpotts

testaram a administração de IFN- α em camundongos infectados com SLEV e observaram que IFN- α reduz a mortalidade decorrente da infecção, mesmo quando administrado como aerossol [69], indicando que IFNs do tipo I também são importantes na infecção por SLEV.

IFN do tipo II, cujo único representante é IFN γ , e IFNs do tipo III, representados por IFNs λ , também são conhecidos por sua capacidade em restringir a replicação de vírus [110, 127], porém com características e mecanismos distintos de IFNs do tipo I (Fig.4).

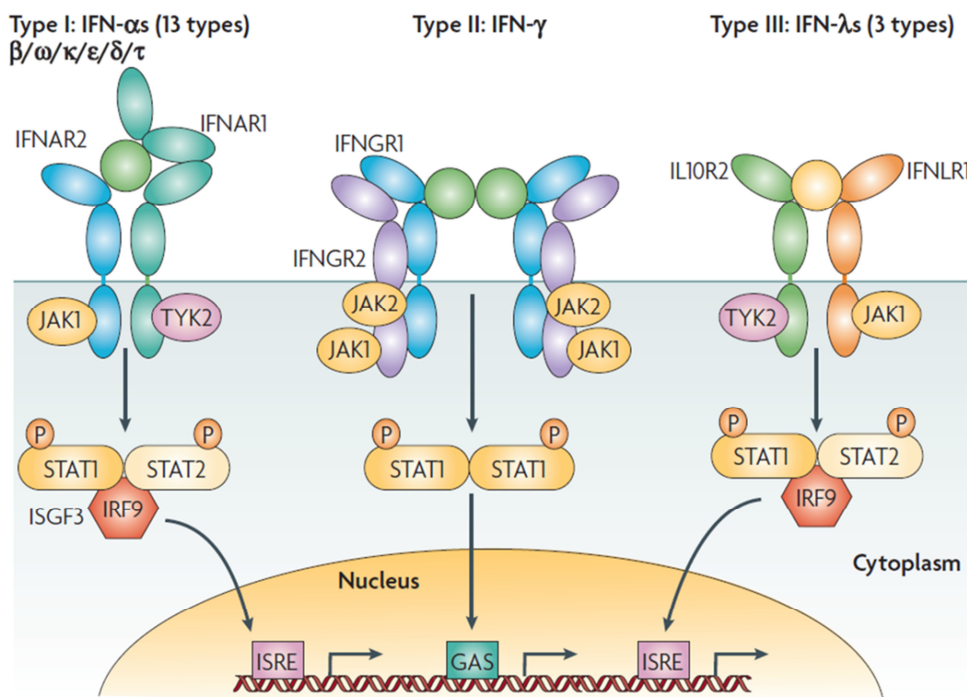


Figura 4 - Ligação dos IFNs tipo I, tipo II e tipo III aos seus respectivos receptores e mecanismo de ação

IFNs tipo I interagem com receptores IFNAR1/2, IFN tipo II com receptores IFNGR1/2 e IFNs tipo III com IFNLR1/ IL10R2. Os receptores de IFNs estão associados à cinases da família JAK, que fosforilam efetores STAT e IRF9, resultando na translocação de fatores de transcrição para o núcleo da célula e consequente expressão de ISGs e outros genes relacionados. Adaptado de Borden e colaboradores [110].

IFN γ é uma proteína glicosilada de 140 aminoácidos (aa) que foi designada em seu próprio grupo em função da discrepância entre sua sequência de aa e as de IFNs do tipo I, e pelo fato de ser produzido principalmente por células NK e linfócitos T CD4⁺. IFN γ possui receptores exclusivos, denominados IFNGR1 e IFNGR2, que ao se ligarem a IFN γ causam a ativação de proteínas-cinases JAK e a fosforilação de STAT1 [128]. IFN γ é importante na transição da resposta imune inata para a adaptativa por contribuir a uma série de mecanismos, tais como: estimular a atividade microbicida e aumentar a expressão de MHC classe II em fagócitos [110], estimular a expressão de MHC classe I em diversos tipos celulares, promover a troca de isotipo

de anticorpos e a polarização de populações de linfócitos T para o perfil T_H1 [129]. $IFN\gamma$ possui um importante papel na resposta inflamatória, pela capacidade em induzir a expressão de moléculas de adesão endoteliais e de quimiocinas pró-inflamatórias, como CXCL9, CXCL10 e CXCL11 [110, 130]. $IFN\gamma$ já foi estudado no contexto de dengue [131, 132], febre amarela [133], encefalite japonesa [134], encefalite transmitida por carrapato [135], encefalite do oeste do Nilo [136] e encefalite de Murray Valley [126], onde $IFN\gamma$ está geralmente associado à proteção do hospedeiro frente à infecção.

$IFNs\lambda$, os representantes de IFNs do tipo III, foram descobertos em 2004 e rapidamente associados à indução de respostas antivirais em superfícies epiteliais e mucosas, onde seu receptor, composto por uma cadeia denominada IFNLR1 e por uma das cadeias do receptor de IL-10 (IL10R2) é expresso [137]. Apesar de também utilizar um receptor distinto ao receptor de IFNs do tipo I, $IFN\lambda$ é capaz de induzir a expressão de ISGs. Poucos estudos foram realizados sobre o papel de $IFNs\lambda$ em infecções por flavivirus, provavelmente devido à descoberta recente de IFNs do tipo III. Até o momento, sabe-se que $IFN\lambda$ é importante para manter a integridade da BBB no contexto de infecção pelo WNV [138].

Muitos dos mecanismos acima descritos, especialmente o papel dos diferentes IFNs e de moléculas efetoras no controle da replicação de flavivirus, foram descobertos pelo estudo de infecções causadas por DENV, WNV, JEV e YFV, e ainda precisam ser estudados no contexto da encefalite de St. Louis.

2. Objetivos

Objetivo principal

Desenvolver e padronizar um novo *modelo de infecção* pelo SLEV em camundongos, de forma a permitir o estudo *in vivo* desta doença.

Objetivos complementares

- Determinar a dinâmica de *disseminação e replicação do SLEV* no cérebro e baço de camundongos infectados;
- Caracterizar a *resposta inflamatória* associada à infecção experimental pelo SLEV e estabelecer parâmetros de doença.
- Estudar a participação dos tipos de IFNs, tipo I, II e III em *mecanismos de doença ou resistência* envolvidos na encefalite de St. Louis

3. Metodologia

3.1. Animais

Camundongos do tipo “selvagem” (WT) da linhagem C57BL/6 e BALB/c foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais). Camundongos da linhagem SV129, WT ou deficientes para o receptor de IFNAR1 e 2 (ABR^{-/-}), são criados no biotério do laboratório de Imunofarmacologia do ICB, UFMG. Camundongos IFN γ ^{-/-} foram doados pela professora Dra. Leda Quércia Vieira, também do ICB/UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério do laboratório até atingirem a idade adequada para experimentação (8 a 12 semanas de idade). Animais foram mantidos sob temperatura controlada (23°C), ciclos de iluminação de 12 horas e ração e água disponível *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de ética em utilização animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 349/2012 (Anexo 4).

3.2. Vírus

A linhagem de SLEV utilizada neste trabalho, denominada BeH 355964, foi provida pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP, SP). Esta linhagem foi obtida a partir de um isolado clínico na década de 1970, de uma paciente com infecção sintomática, residente na região norte do Brasil [139]. O genoma desta linhagem se encontra completamente sequenciado [11] e a mesma já foi utilizada em trabalhos de outros pesquisadores [140-142]. As amostras enviadas pelo Prof. Maurício foram passadas em células C6/36 para criação de estoques e tituladas em células VERO para determinação do título viral, expresso em unidades formadoras de placa (PFU) /mL. Células C6/36 foram cultivadas em meio Leibovitz-15 e células VERO foram cultivadas em RPMI, ambos suplementados com antibióticos e soro fetal bovino (SFB) 5% v/v. Todos os estoques virais e amostras destinadas a quantificação de vírus foram guardadas à -80°C.

3.3. Segurança Biológica

Segundo a legislação brasileira, o SLEV é considerado um organismo de risco biológico 3 [143]. Com base nas normas e recomendações de segurança requeridas à manipulação de vírus classificado em risco 3 [144], utilizamos a sala de cultura nível de biossegurança 2b (NB2) do Departamento de Bioquímica, complementada com práticas e equipamento pessoal utilizados em NB3. Em relação aos experimentos *in vivo*, animais infectados com SLEV foram mantidos em

microisoladores em racks com sistema de ventilação fechado. Todo o material contaminado gerado é neutralizado em hipoclorito de sódio 2% p/v e/ou embalado para descarte de material biológico. O laboratório de Imunofarmacologia adquiriu uma cabine de segurança biológica nível 3, instalada em infraestrutura própria, para melhor atender aos requerimentos de biossegurança, em termos de geração de aerossol e manipulação de tecidos infectados.

3.4. Padronização da infecção em camundongos

Camundongos de 8 a 12 semanas de idade foram infectados com variados inóculos de SLEV BeH 355964 pelas vias i.c. ou intraperitoneal (i.p.), ou inoculados com meio de cultura ou salina 0.9% p/v, como controle. Os volumes injetados corresponderam a 20 µL e 100 µL, pelas vias i.c. e i.p. respectivamente. Para a inoculação i.c., animais foram previamente anestesiados por inalação de isofurano 5% v/v por 1 minuto. Uma seringa de insulina contendo o volume de injeção é posicionada perpendicularmente acima da cabeça do animal e o bisel é inserido no centro e no topo do crânio, com base nos eixos sagital e transversal e no posicionamento dos olhos. A agulha é inserida até a metade do comprimento total, o volume é dispensado e a agulha retirada perpendicularmente. Camundongos injetados são observados por 5-10 minutos para quais quer sinais de lesão após a inoculação de salina ou vírus. Animais foram acompanhados diariamente por 14 dias, para observação de sinais de doença e letalidade após infecção, ou eutanasiados em determinados dias pós-infecção (p.i.) para coleta de amostras. Para coleta de amostras, animais foram anestesiados com cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg para coleta de sangue e submetidos a deslocamento cervical antes da coleta do cérebro e baço. Camundongos sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂ ao fim do período de observação do experimento.

3.5. Quantificação de carga viral

Para determinar a carga viral em estoques virais e amostras de tecidos foram empregadas as técnicas de titulação viral em placa e *Reverse Transcriptase quantitative PCR* (RT-qPCR). Para ambos os métodos, amostras de tecido previamente congeladas a -80°C foram homogeneizadas em suspensões 10% m/v em meio RPMI. O ensaio de titulação se baseou na diluição seriada de amostras e adsorção em placas de cultura contendo monocamadas de células VERO. A adsorção de amostras ocorreu por uma hora na estufa, seguida da remoção das amostras e deposição de DMEM suplementado com 1.5% p/v carboximetilcelulose (CMC) e

2.5% v/v SFB (*overlay*). Após sete dias de incubação, as placas de cultura foram fixadas, lavadas e coradas com cristal violeta 1% p/v. O resultado foi obtido pela contagem das placas de lise formadas pelo SLEV e expresso em PFU/mL de sobrenadante ou PFU/ 100mg de tecido processado.

Para a reação de RT-qPCR, as amostras processadas foram submetidas à extração de RNA usando QIAamp viral RNA extraction kit e, subsequentemente, à síntese de cDNA usando *Random primers* (Promega) e *SuperScript Reverse Transcriptase III* (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada no aparelho 7500 Fast usando reagentes SYBR Green (Applied Biosystems) e primers específicos para o gene NS5 de SLEV (primer *forward* FG1 TCAAGGAACTCCACA CATGAGATGTACT, primer *reverse* nSLE ATTCTTCTCTCAATCTCCGT, comprados de Integrated DNA Technologies (IDT)) [140]. Todas as reações de RT-qPCR para quantificação de SLEV foram acompanhadas de uma curva padrão do amplicon do gene NS5, criada a partir de clonagem do amplicon de 232 pares de bases (bp) em bactérias e extração de plasmídeos. A comparação de amostras com essa curva permitiu a expressão dos resultados em número relativo de cópias genômicas de SLEV por amostra.

3.6. Quantificação de citocinas

Os níveis das citocinas IFN γ , CCL5, CXCL-1, IL-6, IL-1 β e TNF- α foram quantificados nos tecidos (cérebro e baço) de animais infectados por ELISA ou por RT-qPCR. Os níveis das citocinas IL-1 β , IFN- α 4, IFN- β e IL-17 foram determinados por RT-qPCR. Para a técnica de ELISA, amostras de tecido foram processadas a suspensões de 10% m/v em salina complementada com inibidores de protease. A amostra homogeneizada foi submetida ao ensaio de ELISA para quantificação das citocinas de acordo com as instruções do fabricante (R&D systems). O limite de detecção do teste é de 4-8 pg/mL de amostra, e o resultado foi expresso em pg/100 mg de tecido. Para a reação de RT-qPCR, amostras foram processadas para extração de RNA e síntese de cDNA, e as reações foram realizadas como previamente descrito (ver “Quantificação de carga viral”). Primers para amplificação de cada gene alvo foram novamente comprados da empresa IDT, incluso primers para 18S, gene usado como controle *housekeeping*. Os resultados foram obtidos após normalização das amostras em relação ao gene 18S e cálculo segundo o método $\Delta\Delta C_t$ (*cycle threshold*): $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (amostra)- ΔC_t (referência). Os resultados foram expressos como aumento da expressão do RNA relativo ao controle experimental Mock WT.

3.7. Detecção indireta de leucócitos

Utilizamos ensaios de detecção da atividade das enzimas *N*-acetil- β -glucosaminidase (NAG), mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) para detecção indireta de leucócitos recrutados aos tecidos de camundongos ao longo da infecção. Para o ensaio da atividade de NAG, que objetiva a detecção de macrófagos recrutados ao tecido, amostras foram homogeneizadas em salina/ Triton X-100 0.1%v/v, submetidas ao ensaio, baseado na conversão do substrato *p*-nitrofenil- β -glicosaminida, e lidas a 405 nm. Os resultados da atividade de NAG foram calculados de acordo com o volume e cinética da reação, convertidos e expressos em unidades relativas/ mL, referentes à presença de macrófagos no tecido analisado. Para a quantificação da atividade de MPO e EPO, referentes à presença de neutrófilos e eosinófilos no tecido, respectivamente, amostras foram homogeneizadas em PBS contendo hexadeciltrimetilbrometo de amônio (HTAB) 0.5% p/v, 5 mM EDTA. Após três ciclos de choque térmico em nitrogênio, os sobrenadantes foram submetidos a ensaios de conversão de substrato. Para a MPO, o substrato convertido é 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) e a leitura do ensaio realizada a 450 nm. Após conversão dos dados com base em uma fórmula padrão previamente estabelecida no laboratório, o resultado foi expresso em unidades relativas a neutrófilos. Para a EPO, o substrato convertido é o-fenilenediamina (OPD) e a leitura do ensaio realizada a 495 nm com o resultado expresso diretamente em absorbância.

3.8. Análise Hematológica

Amostras de sangue foram obtidas por corte do plexo braquial, coletadas em tubos heparinizados, imediatamente imersas em gelo e posteriormente separadas para contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, hematócrito e coleta de soro. Para contagem total, amostras de sangue foram diluídas em solução de Turk a uma proporção de 1:40, contadas em câmara de Neubauer e o resultado expresso em número total de leucócitos/mL de sangue. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em lâminas contendo esfregaço sanguíneo, coradas com Panótico (Laborclin), e o resultado foi expresso em número total de cada tipo celular, corrigido proporcionalmente ao resultado de contagem total da amostra. Para a contagem de plaquetas, parte do sangue coletado foi diluído 1:100 em oxalato de amônio 1% p/v e deixado em repouso em câmara de Neubauer por no mínimo 20 min. Após a deposição das plaquetas, a contagem é feita ao microscópio e o resultado expresso em número total de plaquetas/ mL de sangue. O microscópio Zeiss ICS Standard 25 foi utilizado para todos os procedimentos de

contagem de leucócitos e plaquetas. A mensuração do índice de hematócrito foi realizada utilizando capilares heparinizados para microhematócrito. Capilares contendo sangue foram centrifugados em centrífuga apropriada e o resultado expresso em porcentagem referente à fração celular do sangue. Por fim, o restante de cada amostra de sangue foi centrifugado para separação e coleta de soro, posteriormente estocado a -20°C até sua utilização.

3.9. Citometria de fluxo

Animais foram anestesiados com sobre dose de cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg e perfundidos com 15 mL de PBS 1x, com a ajuda de uma bomba peristáltica. Em seguida, o cérebro de cada animal foi coletado, macerado individualmente em meio RPMI e centrifugado contra gradientes de Percoll 35% e 70% para separação de leucócitos/micróglia. Após coleta da fração desejada, as células foram lavadas em RPMI e contadas em câmara de Neubauer. A marcação das células procedeu com a adição de anticorpos primários anti-CD3 (número de catálogo 560591), CD4 (número de catálogo 553729), CD8 (número de catálogo 553729), CD69 (número de catálogo 560689), GR-1 (número de catálogo 17-5931-82), F4/80 (número de catálogo 12-4801-82) e anti-NK1.1 (número de catálogo 552878) (todos adquiridos de eBiosciences, BD Pharmingen), fixação em PBS/ formol 4% v/v e leitura no citômetro FACS Canto II (BD Biosciences). Populações celulares analisadas incluíram linfócitos, granulócitos e macrófagos/micróglia, delineadas inicialmente por tamanho/granulosidade nos eixos SSC/FSC e confirmadas pela expressão de marcadores de superfície. A determinação de quadrantes nas populações celulares positivas para os marcadores levou em consideração os controles negativos e grupos marcados com isotipo controle para cada fluorocromo. Os dados foram analisados com o software FlowJo (Tree Star) para obtenção das porcentagens representativas de cada população celular analisada, seguida por conversão em número total de células em função da contagem total de leucócitos purificados de cada cérebro/ animal experimental.

3.10. Análise histológica

Os encéfalos de camundongos foram coletados ao longo da infecção, perfundidos com PBS 1X e fixados em formol tamponado 4% v/v. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram realizados em intervalos de 10 µm ao longo da extensão do órgão, montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. Para o cérebro, cerebelo, hipocampo e tronco cerebral, a gradação do escore se inicia em 0, em referência a tecidos de animais inoculados com salina

(Mock), e é crescente de acordo com a extensão do dano observado, sendo 4 a nota máxima: 0 = nenhuma patologia; 1 = dano tecidual mínimo e/ou inflamação/gliose moderadas; 2 = dano tecidual moderado e/ou inflamação gliose moderadas; 3 = destruição tecidual definida (perda neuronal, dano parenquimal) e inflamação intensa; 4 = necrose (perda completa de todos os elementos teciduais associada à presença de debris). A avaliação das meninges seguiu parâmetros similares: 0 = sem inflamação; 1 = uma camada de células inflamatórias; 2 = duas camadas de células inflamatórias; 3 = três camadas de células inflamatórias; 4 = quatro ou mais camadas de células inflamatórias. A densidade de neurônios apoptóticos ou necróticos foi classificada como não detectável (0), mínima (<10% das células: 1), moderada (10–30% das células: 2), ou numerosa (>30% das células: 3).

Para as marcações histoquímicas, as secções foram submetidas à recuperação antigênica em tampão borato (pH 9.0) a 65-70 °C por 60 minutos, depois lavados em tampão tris salina (TBS), imersas por 1 hora em solução de caseína a 10% (Vector Laboratories) e incubadas por 3 dias, a 4 °C, em anticorpo primário anti-IBA1 (1:500; Wako Chemicals, USA; Rabbit anti-iba-1) ou anti-caspase 3 (1:300; Merck Millipore, DE; Rabbit anti-caspase 3) diluído em TBS 0.1 M (pH 7.2 – 7.4). Posteriormente, as secções foram lavadas em TBS e incubadas *overnight* em solução contendo anticorpo secundário (cabra anti-coelho, anti-camundongo, 1:250 em TBS, Vector© Laboratories). Para inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos em H₂O₂ a 3% em TBS. Após serem lavados em TBS, foram transferidos para a solução contendo complexo avidina-biotina (ABC) (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) por 1 hora. Por fim, os cortes foram expostos a uma solução de diamidobenzidina em concentração 0.6 mg/ml, contendo cloreto de amônia e níquel a 2.5 mg/ml e glicose oxidase a 0.1 mg/ml, para revelação da imunohistoquímica. A confirmação da especificidade da reação foi feita por experimento controle no qual os cortes não são expostos ao anticorpo primário.

3.11. Experimentos comportamentais

Os parâmetros comportamentais e funcionais dos animais foram avaliados primeiramente pela bateria de testes Smithkline/Harwell/Imperial College/Royal hospital/Phenotype Assessment (SHIRPA), ao sexto dia pós-infecção [145, 146]. O SHIRPA consiste em uma bateria de 40 pequenos realizados individualmente em cada camundongo, por meio da manipulação do avaliador e utilização de objetos específicos do SHIRPA. A bateria de testes avalia o desempenho de cada animal e confere pontuações semi-quantitativas, sendo pontuações

maiores correspondentes ao estado normal do camundongo. A bateria de testes foi realizada no ambiente onde os animais são mantidos (Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia), portanto sem a necessidade de ambientação, e fora do horário útil, pela manhã. Os resultados foram expressos como a média da pontuação dos indivíduos de cada grupo experimental.

Para avaliação da atividade locomotora espontânea dos camundongos, utilizamos a técnica de campo aberto, na qual monitoramos a movimentação do animal por meio de uma câmera de vídeo em um espaço circular determinado por 20 min. Utilizando o software Any-Maze (Stoelting Company), calculamos a distância total percorrida por cada animal e as distâncias percorridas em frações de 5 a 5 min (5, 10, 15 e 20 min). Os resultados foram expressos como a média das distâncias percorridas pelos animais de cada grupo experimental, em ambas as avaliações.

3.12. Análises estatísticas

Os resultados foram representados como médias +/- erro padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas usando a análise de variância (ANOVA), precedida de cálculos para determinar se os valores analisados seguiam distribuição gaussiana ou não. Os pós-testes utilizados variaram de acordo com a distribuição das amostras, mas frequentemente foram empregados os pós-testes de Tukey ou de Sidak. Diferenças entre curvas de letalidade foram analisadas usando o teste Log Rank. As análises estatísticas que apontaram valor $P < 0.05$ foram consideradas significativas. Todos os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes, exceto quando discriminado na legenda da figura. Todas as análises estatísticas e montagem de gráficos foram realizadas usando o software Graph Pad Prism versão 6.0.

4. Resultados

4.1. Padronização do modelo murino de encefalite de St. Louis

4.1.1. Sequenciamento completo do genoma de SLEV BeH 355964

A linhagem de SLEV escolhida para o desenvolvimento e padronização do modelo de encefalite de St. Louis foi a linhagem BeH 355964. Esta linhagem foi estabelecida por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, em Belém, Pará, a partir de um isolado clínico obtido uma paciente hospitalizada em 1978 [139]. A paciente, de 21 anos de idade, apresentava febre e dor de cabeça intensa, dentre outros sintomas. O vírus foi isolado por passagem do sangue da paciente em camundongos neonatos, posteriormente propagado em células C6/36 (mosquito). Testes sorológicos identificaram o microrganismo como SLEV, em comparação com uma linhagem protótipo de SLEV isolada em Belém e com outras linhagens de flavivirus. A linhagem BeH 355964 já foi utilizada em estudos de cunho filogenético, epidemiológico e funcional [23, 140-142, 147-149], frequentemente utilizada como linhagem referência de SLEV, e foi parcialmente sequenciada (gene NS5, GenBank, AF246796).

Para complementar a caracterização já existente da linhagem BeH 355964 foi realizado o sequenciamento completo do genoma viral, utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração Illumina. Estoques virais obtidos pela passagem de SLEV em células C6/36 foram submetidos à extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA dupla fita, para posterior sequenciamento na plataforma Illumina. As sequências obtidas foram alinhadas com a ajuda do software Geneious, resultando em um contig de 10861 nucleotídeos que cobriu toda a região codificadora da poliproteína viral e a maioria das regiões não traduzidas (3' e 5'UTR) de SLEV. Genomas de flavivirus possuem aproximadamente 11 kilobases (kb), o que nos levou à estimativa que 98% do genoma fora sequenciado. A análise filogenética do genoma completo de BeH 355964 confirmou que a linhagem pertence ao genótipo V, juntamente com outras linhagens brasileiras de SLEV, com as quais apresenta mais de 97% de similaridade. O genoma completo de SLEV BeH 355964 foi depositado no GenBank sob o número de acesso KM267635, e os resultados do estudo filogenético foram publicados [11] (Anexo 2).

Nossos esforços de caracterização da linhagem BeH 355964 incluíram a padronização de técnicas virológicas, tais como o estabelecimento de ensaios de titulação em placa e de uma

reação de RT-qPCR, para mensuração quantitativa e qualitativa de SLEV (Fig.3). O ensaio de titulação em placa para SLEV foi adaptado a partir do ensaio de titulação em placa para DENV, previamente desenvolvido em nosso laboratório [150-153] (Fig.5A). Os ensaios de titulação em placa mostram placas de lise de fácil observação e contagem, e que são uniformes e consistentes com placas de lise formadas por flavivirus em células VERO. A reação de RT-qPCR foi adaptada da reação de RT-qPCR duplex apresentada nos estudos de Bronzoni e colegas [140], na qual um amplicon de 232 bp é obtido a partir do gene NS5 de SLEV (Fig.5B, 5C). Para propósitos de quantificação, o amplicon do gene NS5 de SLEV BeH 355964 foi clonado em bactérias, das quais plasmídeos contendo o amplicon podem ser produzidos. A preparação de curvas padrão, baseadas na

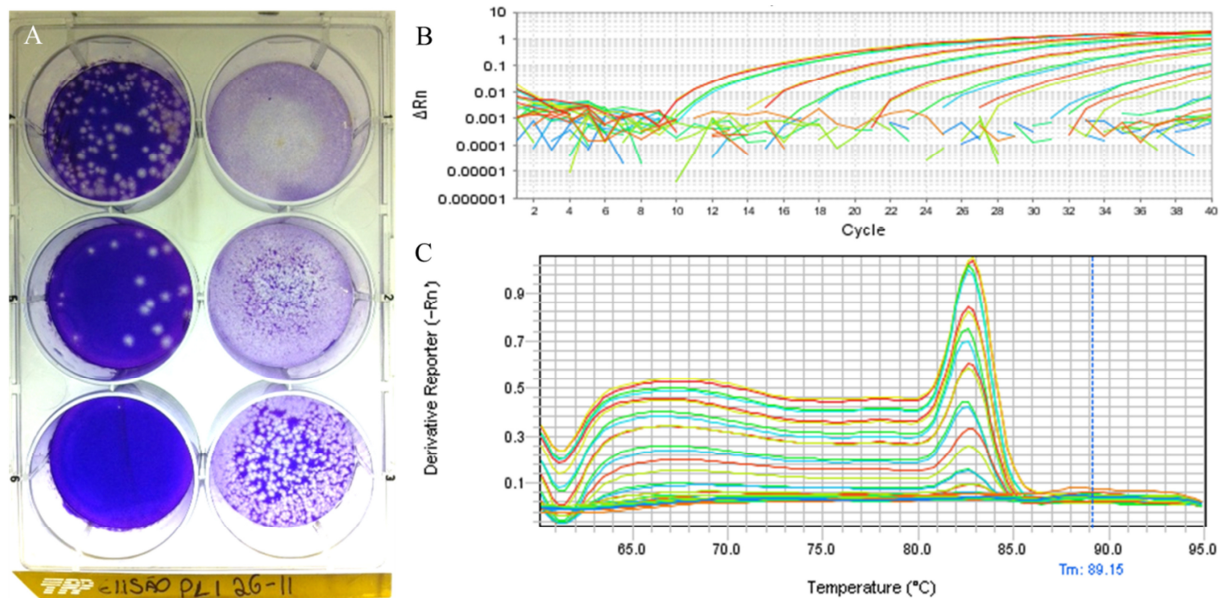


Figura 5 - Caracterização de SLEV BeH 355964 e padronização de técnicas de estudo do vírus

(A) Ensaio de titulação em placa do primeiro estoque de SLEV BeH 355964 estabelecido no laboratório de Imunofarmacologia. Monocamadas de células VERO foram incubadas com diluições seriadas do estoque viral por 1h, seguido da retirada das amostras e deposição do overlay contendo CMC. Placas são fixadas ao sétimo dia de ensaio e coradas para visualização das placas de lise de SLEV. (B-C) Padronização do ensaio de RT-qPCR. Curvas-padrão criadas a partir da diluição seriada de plasmídeos contendo uma cópia do amplicon do gene NS5 de SLEV foram submetidas à reação de qPCR na plataforma 7500. Em (B), curvas de amplificação das diluições seriadas de plasmídeos (vermelho/amarelo - clone 5, verde/verde - clone 8), correspondendo a 10^5 - 10^0 cópias genômicas de SLEV. (C) Respectivas curvas de *melting* das curvas-padrão, consistentes com um único produto de amplificação.

diluição seriada do plasmídeo, é usada como referência para quantificação de SLEV em amostras biológicas, permitindo a conversão dos valores de Ct de amostras em cópias genômicas de SLEV (Fig.5B). Estimamos a sensibilidade das reações em 10 cópias genômicas, com base nos valores de Ct das diluições seriadas. A análise da curva de *melting* das reações é consistente com a

geração de um único produto de amplificação, e indica que a reação é específica e confiável (Fig.5C). Descrições detalhadas das técnicas estão disponíveis na seção de materiais e métodos desta tese (seção 3.5).

O sequenciamento completo do genoma de SLEV BeH 355964 confirmou a identidade da linhagem de SLEV a ser utilizada na padronização do modelo experimental em camundongos. Ainda, o sequenciamento confirmou o genótipo da linhagem BeH 355964 e permitiu a realização de novos estudos filogenéticos de linhagens de SLEV.

4.1.2. A inoculação de SLEV pela via intracranial causa mortalidade em camundongos

Nossos estudos se iniciaram com a inoculação de estoques da linhagem SLEV BeH 355964, a partir daqui referida somente como SLEV, em camundongos BALB/c adultos (8-12 semanas). Para o experimento realizado no Laboratório de Virologia da FAMERP, em São José do Rio Preto (SP), camundongos foram inoculados pelas vias i.c. ou i.p. com o inóculo máximo permitido pelo estoque viral e observados por 14 dias (Fig. 6A). Os resultados mostram que SLEV causou a morte de todos os animais inoculados pela via i.c. em aproximadamente uma semana, enquanto o inóculo administrado pela via i.p. foi incapaz de causar a morte dos animais.

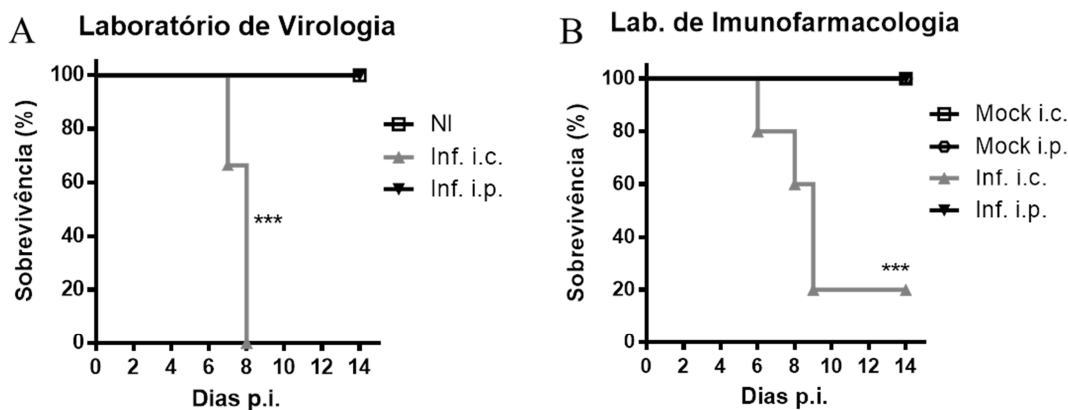


Figura 6 - A inoculação de SLEV pela via intracranial causa mortalidade em camundongos.

Camundongos BALB/c fêmeas de 8-12 semanas de idade foram inoculados com SLEV BeH 355964 pelas vias intracranial (i.c.) ou intraperitoneal (i.p.) e observados por 14 dias após infecção. Inóculos utilizados no experimento no Laboratório de Virologia em São José do Rio Preto (A) foram 5×10^5 PFU e 1×10^5 para as vias i.p. e i.c., respectivamente. Inóculos utilizados no experimento no Laboratório de Imunofarmacologia em Belo Horizonte (B) foram 5×10^4 e 1×10^4 para as vias i.p. e i.c., respectivamente. Dados são expressos como porcentagem de animais sobreviventes em cada grupo experimental NI= não infectado. Inf.= infectado. Mock= injetados com salina. N= 6 animais por grupo. ***P<0.001.

A execução do mesmo experimento no Laboratório de Imunofarmacologia (Belo Horizonte, MG) levou aos mesmos resultados (Fig. 6B), indicando que SLEV é capaz de causar mortalidade quando inoculado pela via i.c. e não pela via i.p., e que esse fenômeno é reproduzido em diferentes laboratórios. Em ambos os experimentos, camundongos não inoculados (NI) ou inoculados com salina (Mock) não apresentaram mortalidade.

Após o estabelecimento da infraestrutura mínima para experimentação com SLEV no laboratório de Imunofarmacologia, realizamos curvas inóculo-resposta em camundongos das linhagens C57BL/6 (Fig. 7A) e SV129 (Fig. 7B), inoculando o vírus pela via i.c. Após inoculação de SLEV, observamos que camundongos da linhagem C57BL/6 são muito mais susceptíveis à infecção que camundongos da linhagem SV129. Camundongos C57BL/6 apresentam 100% de mortalidade quando inoculados com 10^1 PFU de SLEV, ao contrário de camundongos SV129 que sobrevivem completamente à infecção. De forma importante, observamos que a letalidade causada pela injeção intracranial de SLEV é inóculo dependente e que acontece por volta de sete dias p.i. (Fig.7). Novamente, camundongos injetados com salina (Mock) não apresentam mortalidade, indicando que a nossa técnica de injeção não influenciava a mortalidade apresentada por animais infectados.

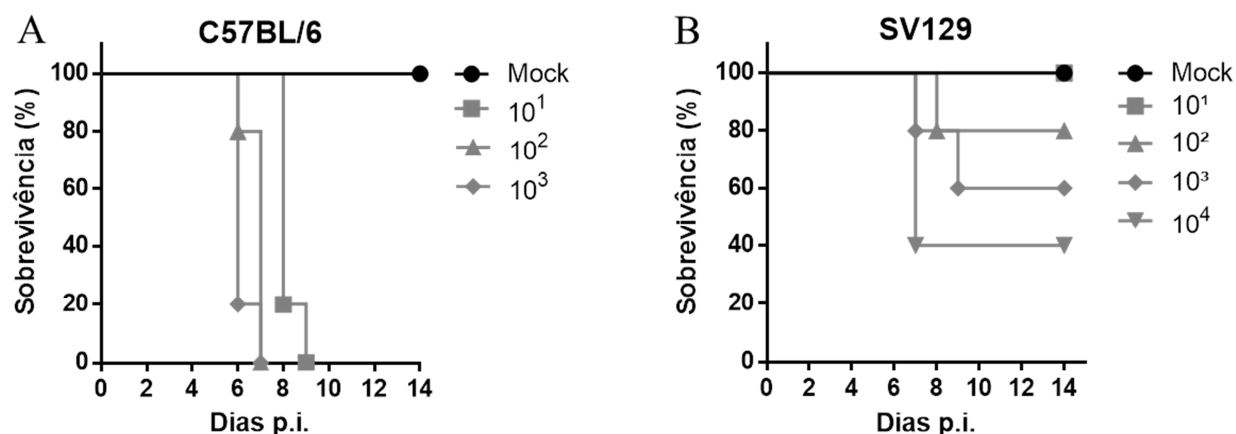


Figura 7 - Camundongos das linhagens C57BL/6 e SV129 apresentam diferentes susceptibilidades à infecção pelo SLEV. Camundongos fêmeas adultos (8-12 semanas) das linhagens C57BL/6 (A) e SV129 (B) foram infectados com diferentes inóculos de SLEV (10^1 a 10^4 PFU) pela via i.c. e observados por 14 dias. Mock - injetado com salina. Dados são expressos como porcentagem de animais sobreviventes em cada grupo experimental. N=5 animais por grupo.

Em paralelo, realizamos uma curva inóculo-resposta em camundongos BALB/c, que apresentaram susceptibilidade intermediária em relação a C57BL/6 e SV129 (dados não mostrados). Também realizamos ensaios comparando a susceptibilidade de machos e fêmeas à infecção intracranial pelo SLEV, que indicaram que machos são moderadamente mais

susceptíveis que fêmeas (dados não mostrados). Por fim, decidimos pelo uso exclusivo de camundongos fêmeas em experimentos futuros. Esse conjunto inicial de dados indica que a inoculação de SLEV pela via i.c. causa a morte dos animais de forma reprodutiva, algo necessário ao estabelecimento de um modelo experimental de infecção/ doença. Portanto, a via i.c. foi escolhida como a via de inoculação do vírus e utilizada em todos os experimentos subsequentes.

4.1.3. A mortalidade causada pelo SLEV em camundongos é associada ao desenvolvimento de encefalite

Com base nas observações que SLEV é capaz de causar mortalidade em camundongos quando inoculado pela via i.c., nós decidimos avaliar a doença causada pelo vírus, com o objetivo de descobrir como SLEV leva o camundongo à morte. Escolhemos camundongos da linhagem C57BL/6 em função da maior oferta dos mesmos no centro de Bioterismo da UFMG e pelo fato de que o Laboratório de Imunofarmacologia possui vários camundongos deficientes em moléculas de interesse, na linhagem C57BL/6. A combinação desses fatores facilita o estudo e identificação de parâmetros da doença causada pelo SLEV.

Os camundongos foram inoculados com uma dose letal (LD_{100}) de SLEV e eutanasiados para coleta de amostras nos dias 3, 5 e 7 após infecção, período que precede e inclui o pico de mortalidade apresentado por animais infectados nos experimentos anteriores. Amostras de cérebro foram coletadas, processadas e inicialmente submetidas a ensaios de titulação em placa (Fig. 8A) e RT-qPCR (Fig. 8B) para mensuração de carga viral. Os resultados apontaram que SLEV se replica no cérebro dos camundongos. A carga viral no cérebro aumenta exponencialmente até o dia 5 p.i. e se mantém em crescimento ao dia 7 p.i., sendo no dia 7 o pico do acúmulo de SLEV nos cérebros infectados, no período avaliado. Cérebros de camundongos injetados com salina (Mock) não apresentaram vírus em níveis detectáveis por nenhuma das técnicas utilizadas.

A replicação de SLEV no cérebro foi acompanhada pela produção local de citocinas pró-inflamatórias (Fig.8C-5H). As citocinas CCL5, IL-6 e CXCL1 (Fig. 8C, 8F, 8G), estão aumentadas ao dia 5 p.i. em comparação ao grupo controle Mock. Os níveis de IL-1 β , TNF- α e IFN γ (Fig. 8D, 8E e 8H) se encontraram aumentados somente no dia 7 p.i. De forma geral, todas as citocinas estudadas estão aumentadas em relação ao grupo controle Mock ao dia 7 p.i.,

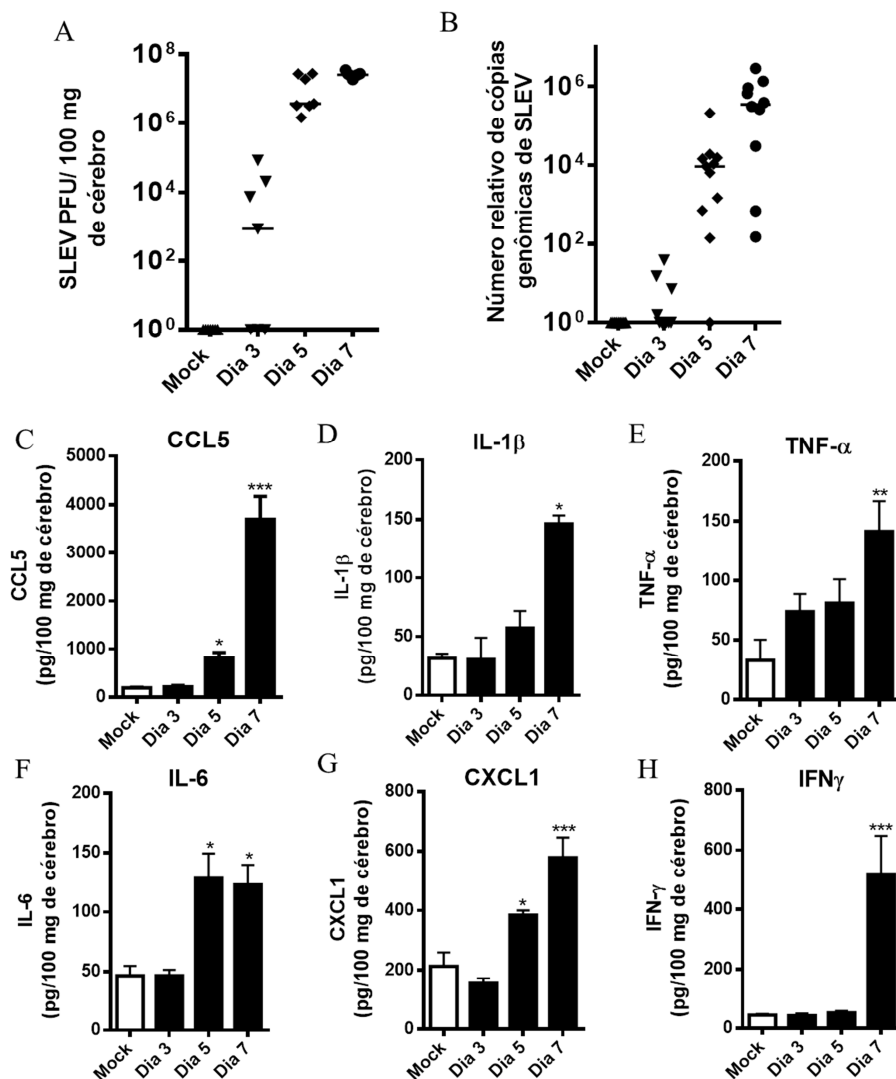


Figura 8 - SLEV se replica no cérebro de camundongos e induz a produção local de citocinas pró-inflamatórias.

Camundongos C57BL/6 fêmeas adultas foram inoculadas com 1 LD₁₀₀ de SLEV pela via i.c. e eutanasiadas aos dias 3, 5 e 7 após infecção para coleta de cérebro. (A, B) A carga viral nos tecidos foi mensurada por titulação em placa (A) e por RT-qPCR (B). (C-H). As citocinas IFN-γ, CCL5, TNF-α, IL-6, CXCL1 e IL-1β foram quantificadas por ELISA em homogenatos de cérebro a 10% p/v. O limite de detecção do teste é de 4-8 pg/mL. Resultados são expressos em média +/- erro padrão da média. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, relativo ao grupo controle Mock. Número amostral mínimo de 7 ou mais por grupo, gráficos representativos de 2 experimentos independentes. Mock= injetado com salina.

indicando que o sétimo dia p.i. também corresponde ao pico de produção de citocinas neste modelo experimental. As citocinas CCL5 (Fig.8C) e CXCL1 (Fig.8D) apresentaram os picos de produção mais expressivos dentre as citocinas estudadas, chegando a 4ng e 0.6 ng por 100mg de cérebro, respectivamente. IFNγ (Fig.8H) também apresentou um pico de produção expressivo, por volta de 0.5 ng por 100mg de cérebro, mas chama a atenção pelo caráter agudo de produção somente ao dia 7. A citocina IL-6 apresentou um perfil de expressão diferente das demais

citocinas avaliadas, atingindo o pico de produção já ao dia 5 p.i., e mantendo os níveis elevados ao dia 7 p.i. (Fig. 8F).

Complementamos o painel de citocinas avaliadas no cérebro com o perfil de expressão dos IFNs do tipo I, no caso $IFN\alpha4$ e $IFN\beta$, mensurados por RT-qPCR (Fig.9). Os resultados indicaram que SLEV induz a expressão de $IFN\alpha4$ (Fig.9A) e $IFN\beta$ (Fig.9B) nos cérebros de camundongos infectados, e que a expressão aumenta ao longo da infecção, atingindo valores máximos ao sétimo dia p.i., como apresentado pelas outras citocinas avaliadas. Os perfis de expressão de $IFN\alpha4$ e $IFN\beta$ são similares, com valores médios quase idênticos para cada tempo avaliado. Portanto, a infecção por SLEV induz a expressão de IFNs do tipo I *in vivo*.

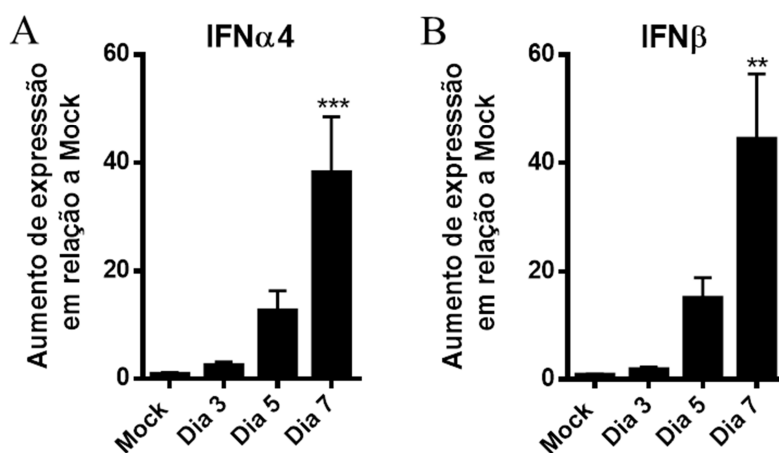


Figura 9 - SLEV induz a expressão de IFNs do tipo I no cérebro de camundongos

Camundongos C57BL/6 fêmeas adultas foram inoculadas com 1 LD₁₀₀ de SLEV pela via i.c. e eutanasiadas aos dias 3, 5 e 7 após infecção para coleta de cérebro. Amostras foram processadas e submetidas a ensaios de RT-qPCR para mensurar níveis de $IFN\alpha4$ (A) e $IFN\beta$ (B). Resultados são expressos em média +/- erro padrão da média. **P<0.01, ***P<0.001, relativo ao grupo controle Mock. Número amostral de 10 ou mais por grupo, gráficos representativos de 2 experimentos independentes. Mock= injetado com salina.

Em paralelo, os baços de animais controle e infectados também foram processados para mensuração da carga viral e dos níveis de citocinas. Os resultados apontaram que no baço de camundongos infectados não há carga viral detectável, e que a expressão de citocinas se encontra em nível basal, similar ao apresentado por camundongos injetados com salina (Mock) (dados não mostrados). Portanto, a infecção com SLEV pela via i.c. não é capaz de atingir e causar a expressão de citocinas no baço.

O fato que a infecção pelo SLEV induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro nos levou ao estudo mais aprofundado da inflamação associada à infecção. Dentre as citocinas pró-inflamatórias estudadas estão as quimiocinas CCL5 e CXCL1 (Fig. 8C, 8G), que

podem mediar o recrutamento de linfócitos e macrófagos, e neutrófilos, respectivamente. Coletamos sangue dos animais utilizados nos experimentos para contagem total e diferencial de leucócitos e utilizamos amostras de cérebro em ensaios de detecção indireta de leucócitos no tecido cerebral (Fig. 10).

A análise hematológica indicou que SLEV causa leucopenia em camundongos ao longo da infecção (Fig.10A). Camundongos infectados já apresentam queda na contagem de leucócitos circulantes a partir do dia 3 p.i. e se mantêm ao dia 5, quando comparados com o grupo controle Mock. A leucopenia se intensifica em animais infectados ao dia 7. A contagem diferencial de leucócitos circulantes indicou que a leucopenia se dá principalmente por linfopenia, já que animais infectados apresentam queda significativa na proporção/número de linfócitos circulantes quando comparados com o grupo controle Mock (Fig.10B). Não houve diferenças na proporção/número de neutrófilos e monócitos entre camundongos Mock e infectados em nenhum dia p.i.

A análise do recrutamento de leucócitos ao cérebro foi baseada na detecção da atividade das enzimas NAG (presente em macrófagos/ micróglia), MPO (presente em neutrófilos) e EPO (em eosinófilos). O ensaio de atividade de NAG não apontou diferenças no recrutamento de macrófagos/ micróglia entre animais infectados e Mock (Fig.10C). A atividade de MPO em cérebros infectados ao dia 7 p.i. aumenta drasticamente e indica um forte recrutamento de neutrófilos (Fig. 10D) ao tecido. Em relação à eosinófilos, um aumento moderado da atividade de EPO no cérebro foi observado ao dia 7 p.i., indicando um recrutamento moderado desta população de leucócitos ao cérebro de camundongos infectados (Fig.10E).

Também realizamos ensaios de contagem de plaquetas e medição de hematócrito no sangue dos camundongos envolvidos no experimento, que não apontaram diferenças entre camundongos infectados e controles saudáveis, indicando que SLEV não causa plaquetopenia ou hemoconcentração neste modelo. A atividade das enzimas NAG, MPO e EPO também foi mensurada em homogenatos de baço e indicou que SLEV não causa o recrutamento de leucócitos ao baço de camundongos infectados, confirmando que a infecção por SLEV não afeta o órgão. À exceção das contagens total e diferencial de leucócitos (Fig. 10A, 10B), todas as alterações nos parâmetros de doença decorrentes da infecção por SLEV se restringiram ao sistema nervoso central (CNS). Portanto, experimentos subsequentes no processo de padronização do modelo não mais envolveram a coleta e análise de amostras de baço.

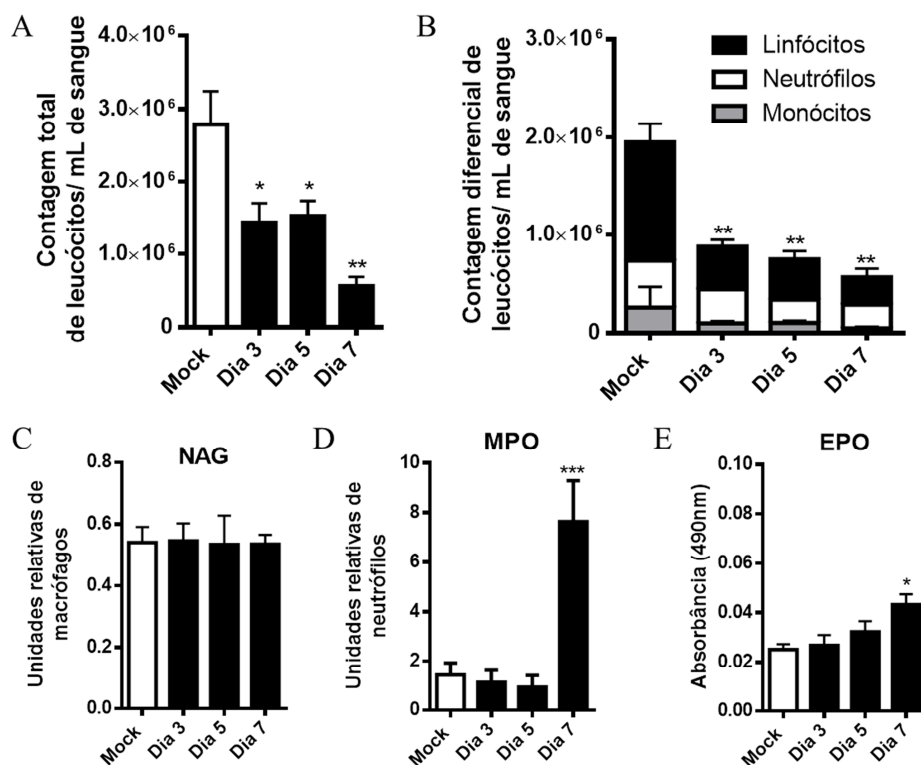


Figura 10 - A infecção por SLEV causa leucopenia caracterizada por linfopenia em camundongos, e leva ao recrutamento de granulócitos ao cérebro

Camundongos C57BL/6 fêmeas adultas foram inoculadas com 1 LD₁₀₀ de SLEV pela via i.c. e eutanasiados aos dias 3, 5 e 7 após infecção para coleta de sangue e cérebro. O sangue foi utilizado para contagem total (A) e diferencial (B) de leucócitos. Amostras de cérebro foram processadas e utilizadas em ensaios para detecção das respectivas enzimas. Gráficos são representativos de 2 experimentos, exceto EPO, que é representativo de 1 experimento. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, relativo aos controles negativos do experimento (Mock). MPO= mieloperoxidase, NAG= n-acetil glucosaminidase, EPO= peroxidase eosinofílica, Mock= injetado com salina

Para estudar o recrutamento de linfócitos ao cérebro de camundongos durante a infecção pelo SLEV, e para confirmação dos dados sobre o recrutamento dos demais leucócitos, foi realizado um experimento de citometria de fluxo, no qual coletamos os cérebros de animais inoculados com salina (Mock) e inoculados com SLEV ao quinto e sétimo dia p.i. Leucócitos foram purificados dos cérebros e submetidos à marcação por anticorpos e leitura ao citômetro. Nossos dados mostraram que há, de fato, recrutamento de leucócitos aos cérebros de camundongos infectados por SLEV (Fig. 11). A figura 11A mostra leucócitos obtidos no processo de purificação e corados com panótico para visualização ao microscópio. A fotomicrografia é representativa de um cérebro infectado ao sétimo dia p.i., mostrando a presença de neutrófilos e de células mononucleadas com morfologia linfoide (Fig.11A). O número médio de leucócitos purificados dos cérebros murinos aumenta ao longo da infecção ao

ponto de quadruplicar em comparação ao controle Mock, ao sétimo dia p.i. (Fig.11B), que corresponde ao pico do recrutamento de leucócitos ao cérebro infectado.

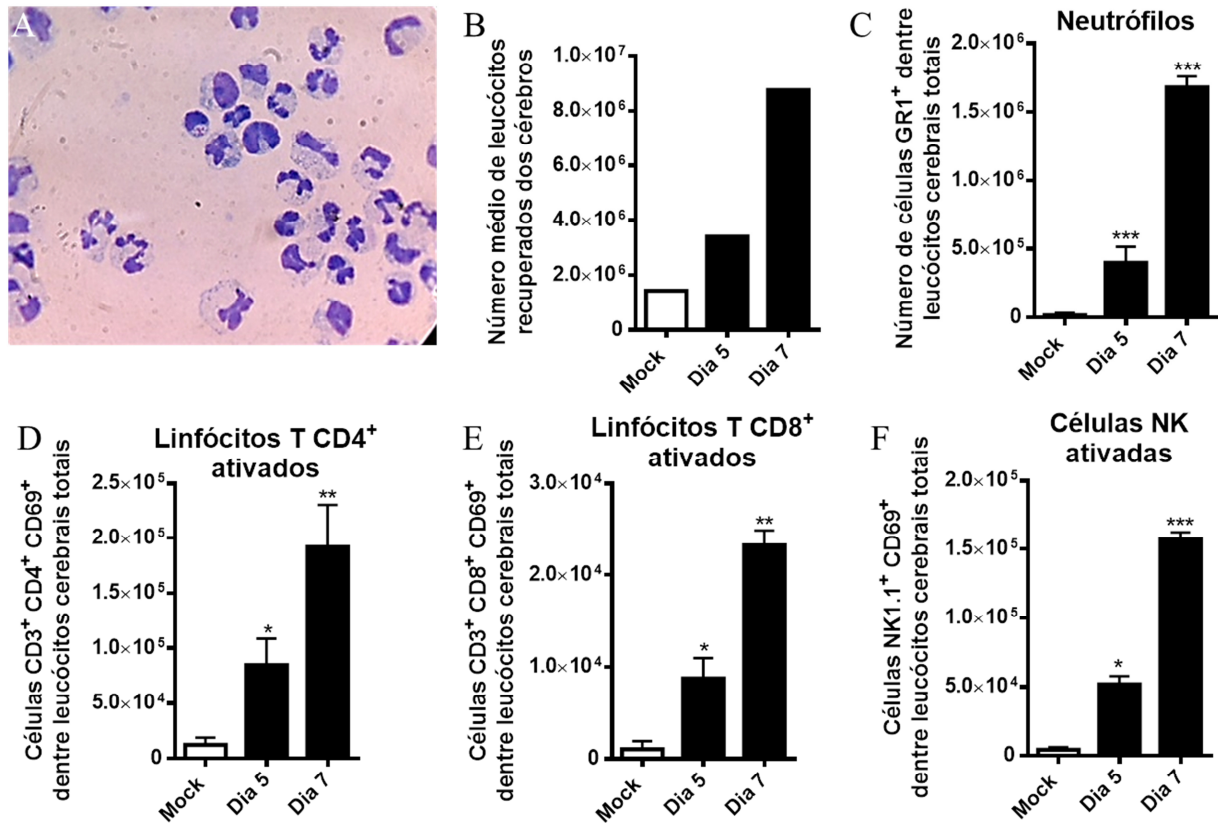


Figura 11 - Neutrófilos, linfócitos T e células NK são recrutados ao cérebro de camundongos infectados por SLEV. Camundongos C57BL/6 fêmeas adultas foram inoculadas com 1 LD₁₀₀ de SLEV pela via i.c. e eutanasiados aos dias 5 e 7 após infecção para coleta de cérebro. Em (A), imagem representativa dos leucócitos recuperados de animais infectados ao sétimo dia pós-infecção, corados com panótico e visualizados ao microscópio ótico (aumento de 40x). Em (B-F), leucócitos extraídos de cérebros foram marcados com anticorpos para marcadores de superfície e examinados ao citômetro de fluxo. Os gráficos mostram as populações de leucócitos encontradas na análise dos resultados, expressos em média do número total de células positivas para os marcadores +/- erro padrão da média. Número amostral de 4-6 por grupo. Gráficos são representativos de 1 experimento. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0,001 relativo ao controle negativo do experimento (Mock= injetado com salina).

A análise das populações de leucócitos confirmou o recrutamento de neutrófilos aos cérebros infectados e indicou que neutrófilos predominam em número sobre outras populações de leucócitos, atingindo 1.5 milhões de células em média nos cérebros infectados (Fig.11C). A utilização de marcadores de superfície de linfócitos nos mostrou que há recrutamento de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK (Fig. 11D, 11E, 11F, respectivamente) aos cérebros infectados e que essas células expressam CD69, um marcador de ativação celular. A abundância de linfócitos T CD4⁺ e células NK nos cérebros infectados é aproximadamente uma ordem de

grandeza menor que a de neutrófilos, e linfócitos T CD8 em duas ordens de grandeza a menos. Todas as populações de leucócitos estudadas estão aumentadas em relação ao grupo Mock já no dia 5 p.i., e atingem o pico de recrutamento ao sétimo dia p.i. Procuramos analisar se linfócitos B também seriam recrutados no contexto de infecção pelo SLEV, mas os resultados foram inconclusivos. Marcações para micróglia e eosinófilos não puderam ser realizadas.

Sumarizando, os dados apresentados nessa seção mostram que SLEV se replica no cérebro de camundongos ao longo da infecção. A replicação viral no cérebro é acompanhada da expressão de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de populações leucocitárias, especialmente neutrófilos e linfócitos T. Sistemicamente, a infecção por SLEV causa leucopenia marcada por linfopenia, mas não afeta o baço. O acúmulo de SLEV, a produção de citocinas e o recrutamento de leucócitos ao cérebro atingem níveis máximos ao sétimo dia p.i., juntamente com o início da mortalidade nos animais infectados, sugerindo que o dia 7 é o pico da infecção/doença neste modelo. A combinação dessas observações indica que SLEV causa inflamação no CNS de camundongos, o que consiste em encefalite, e atende ao objetivo de desenvolver um modelo murino para o estudo da encefalite de St. Louis. Os picos de replicação viral e inflamação no cérebro são concomitantes à mortalidade causada pela infecção, indicando que esses parâmetros de doença estão associados.

4.1.4. A infecção por SLEV causa dano tecidual no sistema nervoso central e resulta em alterações comportamentais

A literatura sobre a encefalite de St. Louis afirma que a morte de pacientes se dá em função de dano ao CNS. Com base na literatura e nos dados de padronização deste modelo de infecção por SLEV, experimentos foram realizados para determinar se a infecção por SLEV leva a dano tecidual no cérebro. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram inoculados com 1 LD₁₀₀ de SLEV e tiveram seus cérebros coletados nos dias 3, 5 e 7 p.i., de forma similar aos experimentos descritos na seção anterior. Camundongos injetados com salina (Mock) foram incluídos como grupo controle. As amostras de cérebro foram processadas para histologia, coradas em H&E e analisadas (Fig. 12).

Os resultados mostraram alterações patológicas progressivas nos cérebros de animais infectados, ao contrário de animais Mock, cujos cérebros apresentaram aparência normal (Fig. 12A, 12B). Ao terceiro dia pós-infecção, os camundongos não apresentaram alterações, exceto

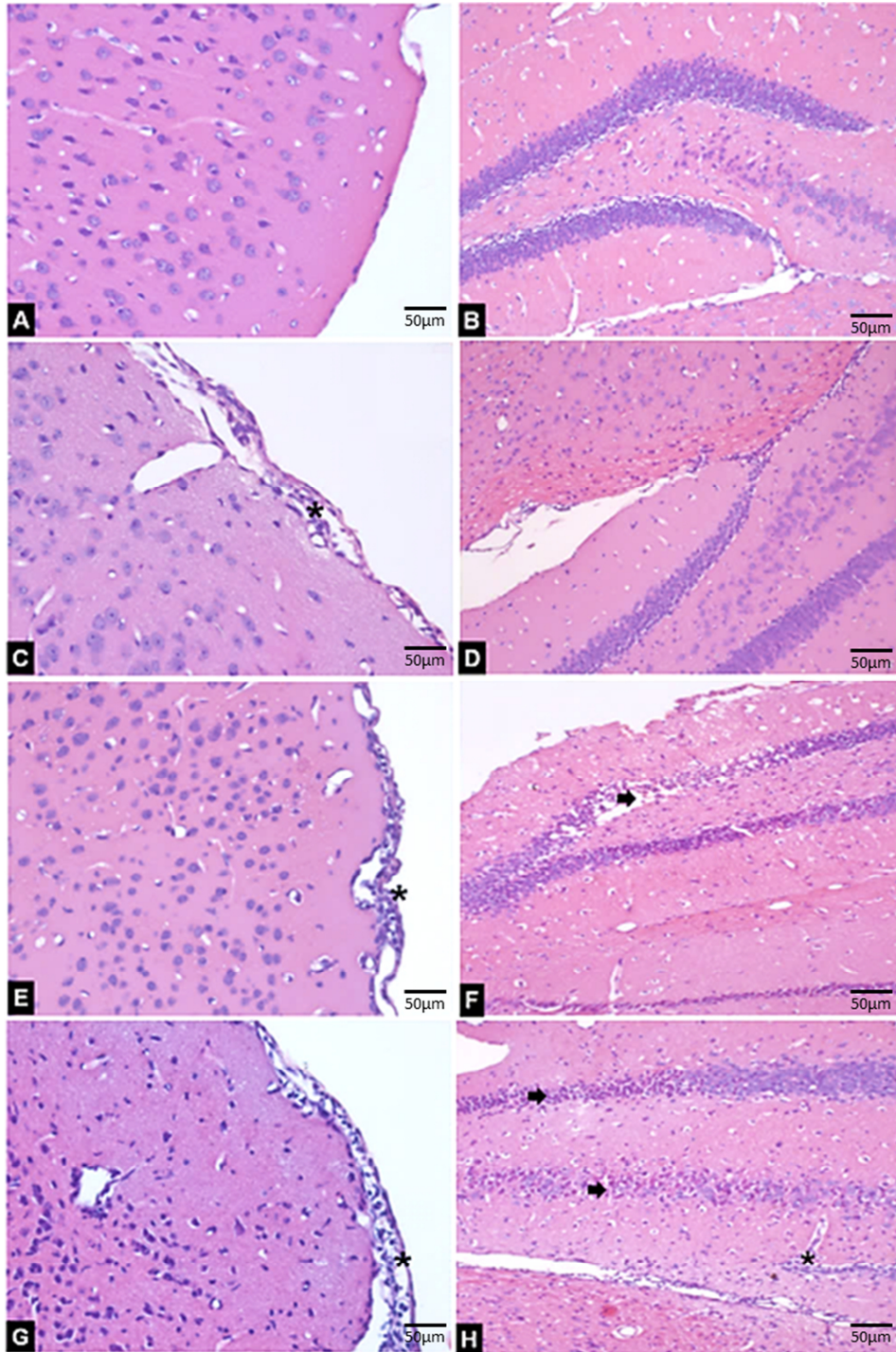


Figura 12 - A infecção por SLEV causa dano cerebral em camundongos, com meningite e perda neuronal no hipocampo. Camundongos C57/BL6 fêmeas adultas foram inoculadas com 1 LD₁₀₀ e eutanasiados aos dias 3 (C, D), 5 (E, F) e 7 (G, H) após infecção para coleta do cérebro. Cortes histológicos foram corados com H&E e visualizados ao microscópio óptico. Em (A) e (B), cortes de cérebro e de hipocampo de animais injetados com salina (Mock). Em (B-D) e em (F-H), cortes de cérebro e hipocampo, respectivamente, de animais ao longo da infecção. As imagens mostram meningite (asterisco - B e C) e meningoencefalite com microgliose (D). O hipocampo exibiu destruição neuronal progressiva (setas) e infiltrado de leucócitos (asterisco, F). Aumento de 400x em (A, C, F, G) e de 200x em (B, D, F, H). Número amostral de três por grupo. Gráficos são representativos de um experimento.

um pequeno infiltrado de neutrófilos e mononucleares no cérebro de um animal (Fig. 12C, 12D). Ao quinto dia de infecção, camundongos apresentaram meningite caracterizada pelo infiltrado de leucócitos mononucleares e neutrófilos (Fig. 12E). Camundongos ao quinto dia de infecção também apresentaram influxo de leucócitos ao redor de vasos sanguíneos e nos neuropilos (áreas de concentração sináptica) cerebral e hipocampal (Fig. 12F). Em especial, o hipocampo mostrou sinais de vacuolização e destruição neuronal nas regiões CA e no giro denteado. Ao sétimo dia pós-infecção foram observados vários vasos sanguíneos reativos, com acúmulo de células mononucleares nas regiões perivasculares e parenquimais do tecido. Foi possível notar a presença numerosa da micróglia nos neuropilos do cérebro, do tronco cerebral e do hipocampo (Fig. 12G, 12H). O hipocampo apresentou intensa destruição neuronal na camada piramidal das áreas CA e degeneração de células granulares (neurônios) (Fig. 12H).

As lâminas histológicas também foram submetidas a uma análise semi-quantitativa da patologia cerebral associada à infecção. As regiões das meninges, córtex, hipocampo e tronco cerebral foram analisadas com base em um escore onde o valor mínimo (0) corresponde à normalidade e o valor máximo (4) corresponde ao maior grau de dano tecidual (Fig. 13), sendo o valor 0 estabelecido com base em cérebros de camundongos injetados com salina (Mock). Os resultados corroboram as mudanças patológicas progressivas previamente observadas em cérebros infectados, e são indicativos de meningite (Fig.13A), dano cerebral (Fig.13B) e dano no tronco cerebral (Fig.13D) a partir do quinto dia de infecção. Dano hipocampal foi confirmado no sétimo dia de infecção (Fig.13C). Os escores dos cérebros de animais ao terceiro dia de infecção não mostraram qualquer alteração. Pudemos avaliar os cerebelos de alguns animais, que também mostram lesões decorrentes da infecção (dados não mostrados).

Portanto, a análise histológica corroborou nossos dados prévios, indicando que há um recrutamento significativo de leucócitos aos cérebros de camundongos infectados, e que este recrutamento se intensifica ao longo da infecção. A análise histológica confirmou a ocorrência de encefalite causada por SLEV, incluindo a ocorrência de meningite, e indicou que a infecção causa dano tecidual caracterizado por perda neuronal no hipocampo. Ainda, a análise histológica indicou que a micróglia está envolvida na infecção por SLEV.

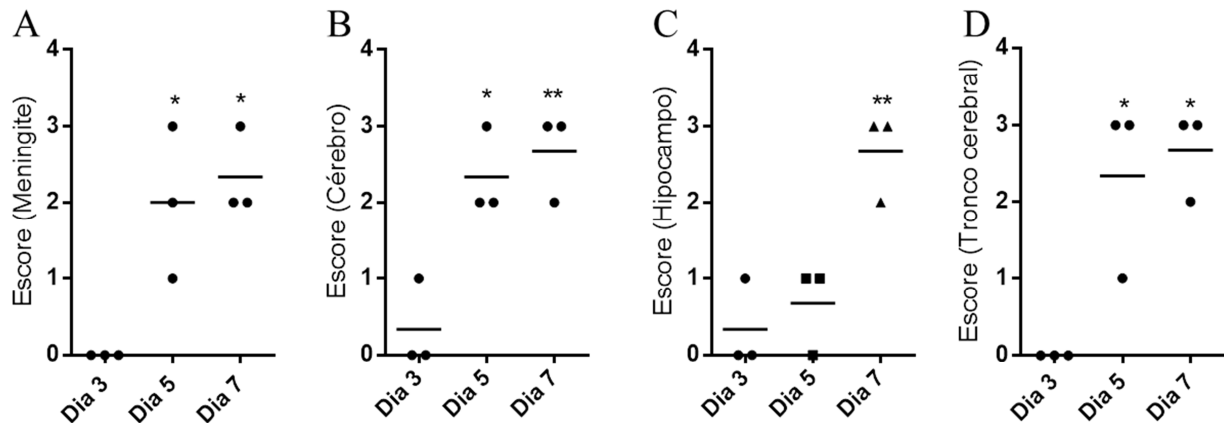


Figura 13 - Alterações histopatológicas nos cérebros de camundongos acometidos pela encefalite de St. Louis experimental se estende às meninges, cérebro, hipocampo e tronco cerebral.

Cortes histológicos oriundos de camundongos infectados, ao longo da infecção SLEV foram submetidos a uma análise semi-quantitativa baseada em uma escala crescente de quatro pontos, sendo quatro o valor para dano máximo observado e a escala normalizada de acordo com o grupo Mock (para detalhes, ver “Metodologia”). Resultados são expressos como *dot-plot*, com a média dos escores dados a cada grupo experimental. Número amostral de três por grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, relativos ao grupo dia 3.

Em seguida, buscamos avaliar se o dano tecidual causado pelo SLEV poderia levar a alterações comportamentais, tipicamente observadas em pacientes com encefalite de St. Louis ou em recuperação da doença. Ao longo dos experimentos, observamos que camundongos infectados por SLEV geralmente não manifestam sinais claros de doença antes do sexto dia p.i. Ao sétimo dia p.i. (pico da infecção), camundongos adoecem de forma aguda, apresentando sinais como eriçamento de pelos e encurvamento do dorso. Ainda, camundongos ao sétimo dia p.i. são incapazes de se posicionar normalmente e frequentemente são encontrados caídos e/ou paralisados. Manifestações oculares, similares à conjuntivite são frequentemente observadas no pico da infecção. Essas manifestações precedem a morte dos animais em algumas horas. Assim, para caracterizar as evidentes alterações comportamentais, utilizamos duas técnicas de avaliação comportamental: a bateria de testes SHIRPA e o teste de campo aberto.

A bateria de testes SHIRPA pontua vários aspectos da função neurológica do camundongo em escores específicos (neuropsiquiátrico, motor, muscular e força, autonômico, reflexo e sensorial) proporcionando uma perspectiva geral do comportamento do animal. Animais C57BL/6 foram novamente inoculados com uma LD_{100} de SLEV, acompanhados por um grupo de camundongos inoculados com salina (Mock), e submetidos à bateria de testes ao sexto dia p.i. (Fig.14). A data escolhida se deve ao fato que camundongos se encontram incapacitados ao dia 7, o que inviabiliza e torna desnecessária a execução do SHIRPA, uma vez

que as alterações neurológicas são óbvias. Os resultados do SHIRPA indicam que camundongos infectados apresentam um déficit nas funções neuropsiquiátrica (Fig.14A) e reflexa e sensorial (Fig. 14B) em comparação a camundongos Mock. Apesar de haver uma tendência à redução no escore motor em camundongos infectados, não observamos alterações com poder estatístico neste e nos demais parâmetros (autônomo, tônus muscular e força) (Fig.11C-E). Logo, nossos dados indicam que camundongos infectados pelo SLEV desenvolvem alterações comportamentais mesmo antes do pico da infecção e doença.

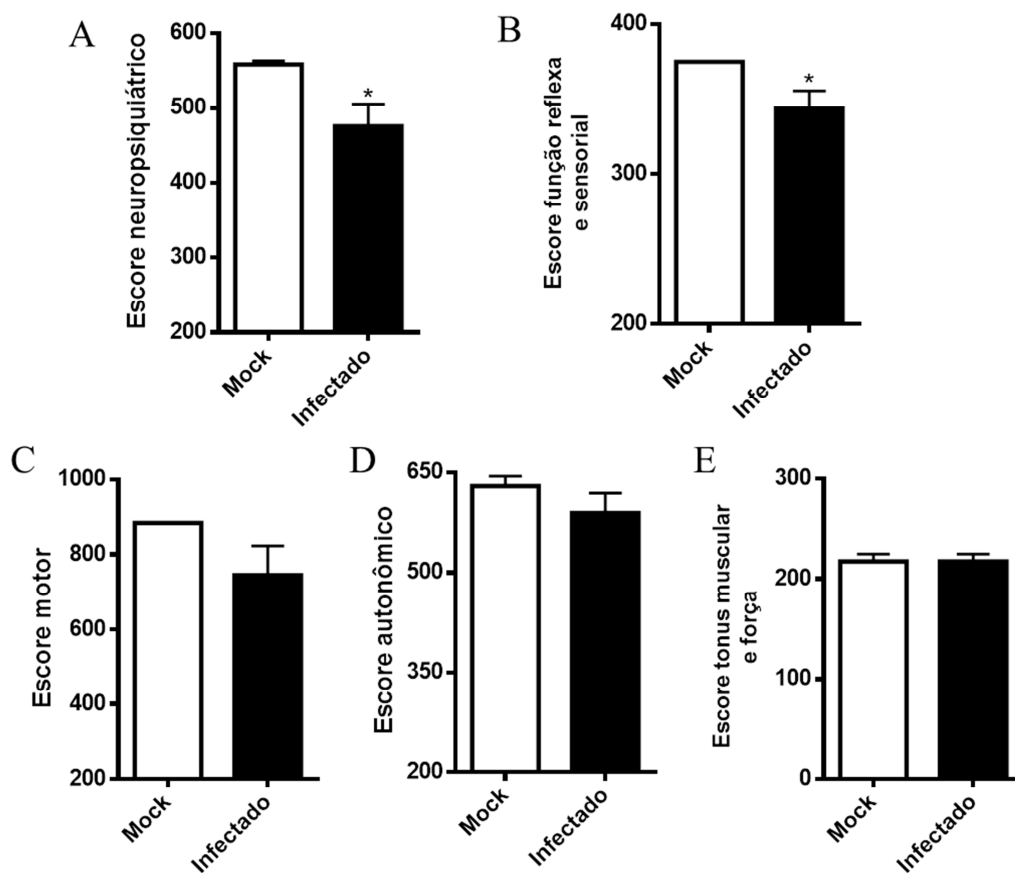


Figura 14 - A infecção experimental por SLEV causa reduções nas funções sensoriais, reflexas e neuropsiquiátricas em camundongos.

Camundongos C57BL/6 fêmeas adultas foram inoculadas com salina (Mock) ou com 1 LD₁₀₀ (infectado) e submetidas à bateria de testes SHIRPA para avaliação de funções gerais e neurológicas, ao sexto dia p.i. Gráficos representam escores de função neuropsiquiátrica (A), função sensorial e reflexa (B), função motora (C), função autônômica (D) e tônus muscular e força (E). Valores plotados representam a média do escore +/- erro padrão da média para cada grupo experimental. N amostral de 8 animais por grupo. *P<0.05 relativo ao grupo Mock. Gráficos são representativos de 1 experimento.

Para complementar os estudos comportamentais, realizamos um teste de campo aberto, que mensura a movimentação espontânea do camundongo em um ambiente controlado. Grupos de camundongos C57BL/6 foram inoculados com uma LD₁₀₀ de SLEV, para avaliar a atividade

espontânea antes do pico da doença (dia 6 p.i.), ou inoculados com uma LD₅₀ de SLEV, para avaliar a atividade espontânea dos camundongos antes e depois do pico da doença (Fig.15). Os dados mostram que, ao sexto dia p.i., camundongos Mock ou inoculados com SLEV percorrem as mesmas distâncias no campo aberto, indicando que não há diferença na atividade espontânea dos camundongos entre os grupos experimentais (Fig.15A). Camundongos sobreviventes à infecção foram testados novamente ao décimo segundo dia p.i. juntamente com os controles Mock., 5 dias após o pico da doença/mortalidade (dia 12 p.i.). Nossos dados mostraram que camundongos infectados se movimentaram menos que os camundongos controle, indicando que a infecção causou uma diminuição na atividade espontânea em camundongos sobreviventes (Fig. 15B).

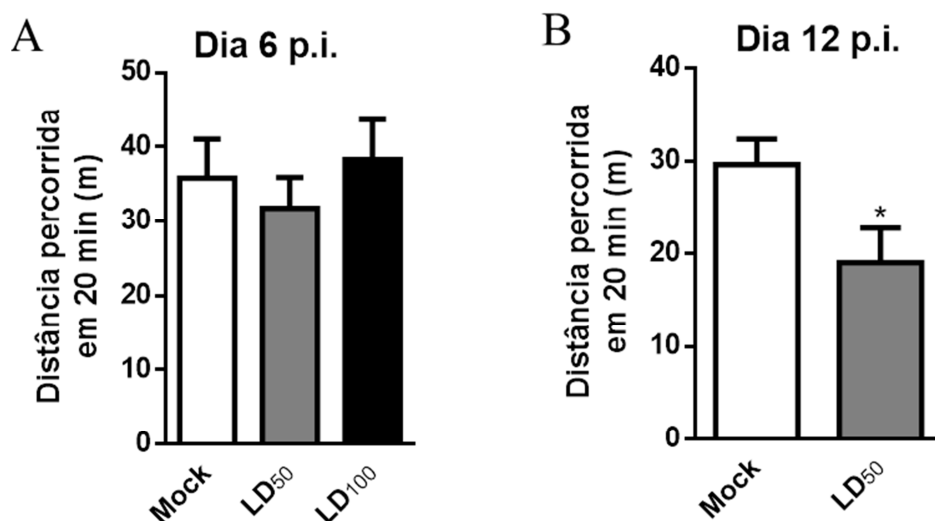


Figura 15 - Camundongos que sobrevivem à infecção pelo SLEV apresentam atividade locomotora espontânea reduzida. Camundongos C57BL/6 fêmeas adultas foram inoculadas com salina (Mock), com uma dose não letal (LD₅₀) ou com uma dose letal (LD₁₀₀) de SLEV pela via i.c. e submetidas ao ensaio de campo aberto para avaliação da atividade locomotora espontânea, ao sexto dia (A) e ao décimo segundo dia (B) após infecção. Gráficos de representam a média da distância total percorrida em 20 minutos (esquerda) +/- erro padrão da média para cada grupo experimental. N = 8 animais para experimentos ao dia 6 p.i. e de 4 animais ao dia 12 p.i. *P<0.05 relativo ao grupo Mock. Gráficos são representativos de 1 experimento.

Sumarizando, estes dados indicam que a infecção pelo SLEV causa dano tecidual no CNS de camundongos. O dano tecidual é caracterizado por inflamação, corroborando dados prévios, e por morte neuronal. Camundongos infectados desenvolvem alterações comportamentais antes e durante o pico da infecção, certamente associadas ao desenvolvimento da doença e acometimento do CNS. Alterações comportamentais também podem ser observadas em animais que sobrevivem à mesma, de forma similar ao observado na doença em humanos. As

manifestações agudas de doença e o dano tecidual ocorrem no sétimo dia p.i., confirmando que a infecção/ doença neste modelo de infecção por SLEV atinge o pico em sete dias p.i.

Estes dados finalizam a seção 4.1 de resultados, padronizando e caracterizando o modelo de encefalite de St. Louis em camundongos. De forma resumida, o modelo foi estabelecido pela inoculação de SLEV pela via i.c. em camundongos fêmeas adultas. A infecção se desenvolve principalmente no CNS, sendo caracterizada por replicação viral, produção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de leucócitos, dano tecidual, alterações comportamentais e, finalmente, em morte. As seções seguintes se baseiam nos dados de padronização da infecção/ doença para investigação de mecanismos de patogênese e/ou resistência à infecção por SLEV, em relação à resposta de IFNs e suas propriedades antivirais.

4.2. Estudo dos papéis dos IFNs no modelo murino de encefalite de St. Louis – IFNs do tipo I

4.2.1. IFNs do tipo I e tipo II possuem papéis distintos na infecção experimental pelo SLEV

A caracterização deste modelo de encefalite de St. Louis mostrou que SLEV se replica nos cérebros de camundongos e que o pico de carga viral está associado à ocorrência de mortalidade. IFNs são definidos por sua capacidade em restringir infecções virais e seus papéis foram avaliados no contexto da infecção experimental pro SLEV. Para tal, infectamos camundongos deficientes nos receptores de IFN tipo I ($ABR^{-/-}$) e, separadamente, camundongos deficientes em IFN tipo II ($IFN\gamma^{-/-}$). Os experimentos incluíram grupos controle compostos por camundongos do tipo selvagem (WT) para os respectivos camundongos deficientes, que são de linhagens diferentes ($ABR^{-/-}$ em SV129, $IFN\gamma^{-/-}$ em C57BL/6).

De forma inesperada, a infecção dos animais $ABR^{-/-}$ e $IFN\gamma^{-/-}$ resultou em fenótipos distintos (Fig.16). Camundongos $ABR^{-/-}$ são extremamente susceptíveis à infecção pelo SLEV (Fig.16A). O inóculo de 10^2 PFU de SLEV causou a morte de 20% dos animais WT, corroborando dados da curva inóculo-resposta padronizada em camundongos SV129 (Fig. 7). Em contrapartida, camundongos $ABR^{-/-}$ infectados com o mesmo inóculo apresentaram 100% de mortalidade, que ocorreu de forma antecipada, precedendo o pico da infecção observado na padronização do modelo. No experimento envolvendo IFNs tipo II (Fig. 16B), camundongos

foram inoculados com 10^1 PFU de SLEV, resultando na morte de aproximadamente 80% dos animais WT. Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ infectados com o mesmo inóculo demonstraram resistência moderada em comparação aos WT, apresentando 50% de mortalidade.

Assim, os resultados dos experimentos de sobrevivência após a infecção com SLEV indicam que a resposta de IFNs do tipo I é importante para o hospedeiro, pois a ausência dos receptores de IFNs do tipo I *in vivo* resulta em aumento marcante na mortalidade p.i. IFNs do tipo II, ao contrário, não são importantes para o hospedeiro no contexto da infecção por SLEV, pois a ausência de $IFN\gamma$ *in vivo* resulta em um aumento moderado de sobrevivência. Experimentos subsequentes foram concebidos e executados com o objetivo de delinear e caracterizar a contribuição de cada um dos tipos de IFN neste modelo experimental, iniciado pela investigação dos papéis de IFNs do tipo I.

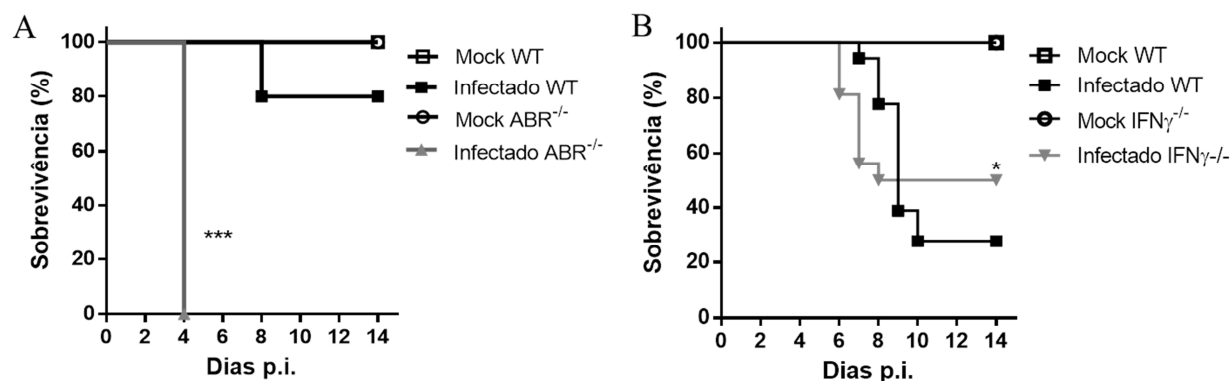


Figura 16 - IFNs tipo I e tipo II possuem papéis distintos na infecção experimental pelo SLEV

(A) Camundongos WT e $ABR^{-/-}$ na linhagem SV129 foram inoculados pela via i.c. com 10^2 PFU de SLEV e observados por 14 dias. (B) Camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ na linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via i.c. com 10^1 PFU de SLEV e observados por 14 dias. Resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência, obtidos pela combinação de 3 experimentos ($n=10-18$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$ em comparação aos respectivos grupos WT infectados.

4.2.2. IFNs do tipo I estão envolvidos no controle da replicação de SLEV

Para investigar o papel dos IFNs do tipo I neste modelo experimental, nós inoculamos SLEV em camundongos WT e $ABR^{-/-}$ para estudo dos parâmetros de doença associados à infecção. Amostras de tecido foram coletadas ao terceiro dia p.i., em função do alto índice de mortalidade apresentado pelos animais ao quarto dia p.i. (Fig.16A). Amostras de cérebro foram processadas e analisadas primeiramente para o estudo da carga viral, sendo submetidas a reações de RT-qPCR para detecção de SLEV (Fig.17). Nossos resultados mostram que animais $ABR^{-/-}$ infectados possuem uma alta contagem de cópias genômicas de SLEV já ao terceiro dia p.i.,

excedendo a contagem média do grupo WT infectado em quase 100 vezes (Fig.17A). Cérebros de camundongos dos grupos Mock WT ou $ABR^{-/-}$ foram negativos para a presença de SLEV. A facilidade com que SLEV se replicou no cérebro de camundongos $ABR^{-/-}$ nos levou a considerar se a infecção poderia tomar proporções sistêmicas nesses animais. Assim, mensuramos o número de cópias genômicas de SLEV em amostras de baço dos animais dos mesmos experimentos, e observamos que os tecidos de $ABR^{-/-}$ são positivos para SLEV (Fig.17B). Como esperado, e de forma similar aos experimentos de padronização, baços de camundongos Mock e WT infectados foram negativos para a presença de SLEV.

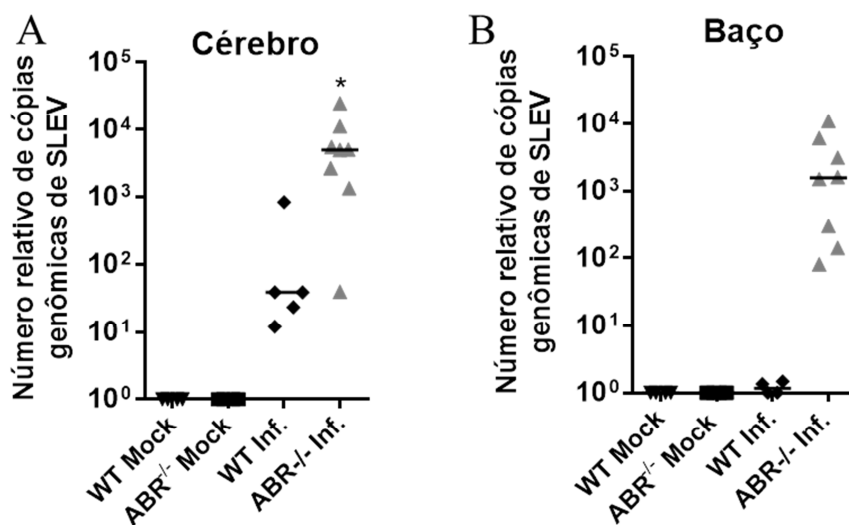


Figura 17 - IFNs do tipo I são importantes para o controle da replicação de SLEV *in vivo*
 Camundongos foram inoculados com 10² PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 3 p.i. para coleta de cérebro (A) e baço (B). A carga viral foi mensurada por RT-qPCR e expressa em número relativo de cópias genômicas. A mediana é representada pela barra. Mock= injetado com salina, Inf.= infectado. *P<0.05 em relação ao grupo WT inf.

Nossos dados indicam que IFNs do tipo I são importantes para o controle da replicação de SLEV *in vivo*. A condição de deficiência em IFNs do tipo I resulta no aumento expressivo da carga viral no cérebro e na disseminação sistêmica da infecção, que corroboram a mortalidade aumentada dos animais $ABR^{-/-}$.

4.2.3. A replicação acelerada de SLEV leva a produção precoce de citocinas no cérebro de camundongos $ABR^{-/-}$, mas não afeta outros parâmetros inflamatórios da doença

Amostras oriundas dos experimentos com camundongos WT e $ABR^{-/-}$ também foram estudadas para determinar o grau da inflamação e dano tecidual desenvolvidos na doença induzida por SLEV. Amostras de cérebro foram processadas para mensuração dos níveis de citocinas induzidas pela infecção, indicando que animais $ABR^{-/-}$ apresentam níveis elevados das

citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , CCL5 e CXCL1 já ao terceiro dia p.i. (Fig.18B-D), em comparação ao respectivo grupo controle Mock e ao grupo infectado WT. Não foi detectado aumento nos níveis de IFN γ nos cérebros de animais deficientes (Fig.18A). O grupo WT infectado apresentou expressão basal das citocinas mencionadas ao terceiro dia p.i., corroborando os dados de padronização do modelo (Fig.8). Em paralelo, amostras de baço também foram avaliadas para a expressão de citocinas, por RT-qPCR, e os resultados mostraram um perfil similar ao observado no cérebro, no qual animais Mock e WT infectados apresentam expressão basal de citocinas-pró-inflamatórias, enquanto animais ABR^{-/-} infectados possuem expressão aumentada, ao terceiro dia p.i. (dados não mostrados).

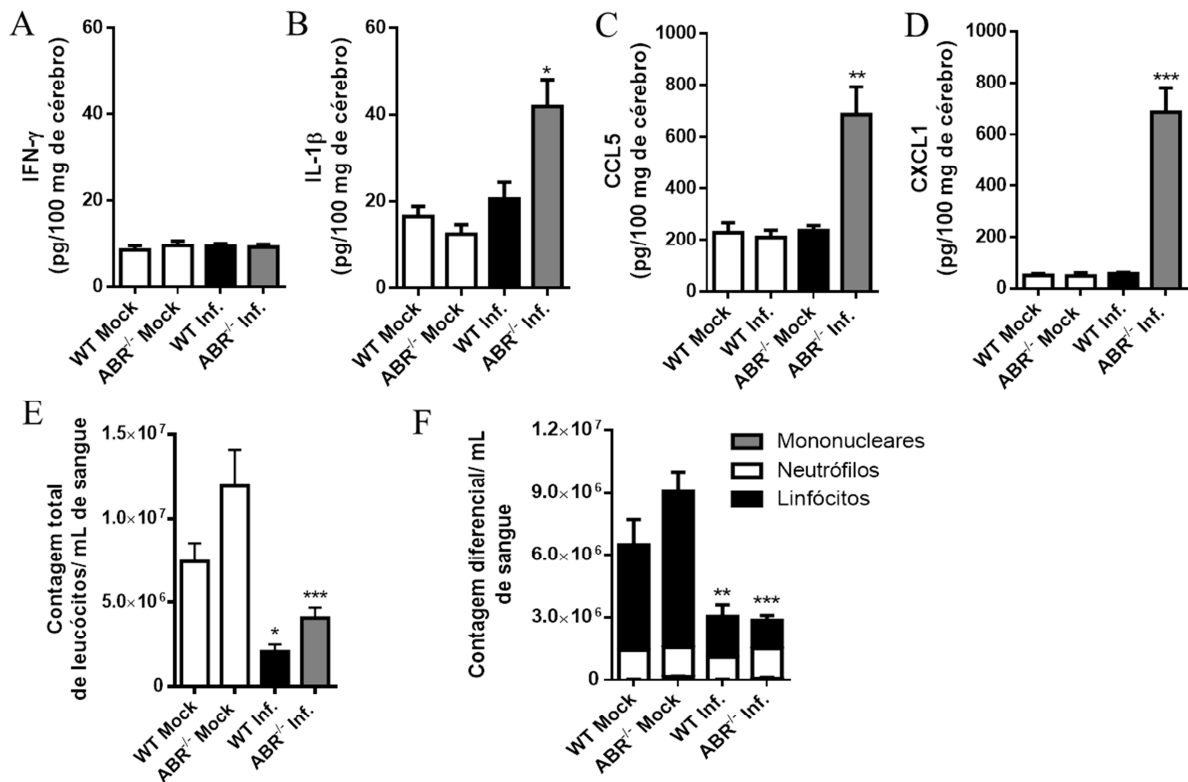


Figura 18 - A infecção por SLEV causa a expressão antecipada de citocinas no cérebro de animais ABR

Camundongos foram inoculados com 10² PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 3 p.i. para coleta de cérebro e sangue. (A-D) Níveis de citocinas no cérebro foram mensurados por ELISA e expressos em pg por 100 mg de tecido. (E-F) Contagens total e diferencial dos leucócitos circulantes foram realizadas em amostras de sangue e expressas em contagem por mL de sangue. Mock= injetado com saline, Inf.= infectado. (A-D) *P<0.05, **P<0,01, ***P<0,001 relativos os respectivos controles Mock e ao grupo WT inf. (E-F).

Também analisamos o sangue dos animais utilizados no experimento para contagem total e diferencial de leucócitos. Camundongos WT Mock apresentaram contagens totais normais (Fig.18E), enquanto camundongos ABR^{-/-} Mock aparentam possuir uma contagem total de

leucócitos aumentada em condições basais, algo não confirmado pela análise estatística. Como esperado, ambos os grupos de camundongos infectados apresentaram leucopenia ao terceiro dia p.i. quando comparados com os respectivos grupos Mock (Fig.18E). Apesar da queda na contagem de leucócitos no grupo ABR^{-/-} infectado ser mais expressiva do que a queda no grupo WT infectado, não há diferenças na contagem total entre os grupos infectados. A contagem diferencial de leucócitos (Fig.18F) indicou que a leucopenia ao dia 3 p.i. é devida à linfopenia, como observado nos experimentos de padronização, devido à queda significativa da proporção/contagem de linfócitos no sangue de animais infectados quando comparados aos controles Mock. Não observamos diferenças na linfopenia apresentada entre os grupos WT e ABR^{-/-} infectados, corroborando os dados obtidos na contagem total de leucócitos.

Em seguida, avaliamos se a carga viral aumentada e a produção precoce de citocinas nos cérebros de camundongos ABR^{-/-} estariam acompanhadas de outros parâmetros de doença, como o recrutamento de leucócitos e dano tecidual no cérebro. Amostras de tecido cerebral foram processadas e avaliadas para a atividade das enzimas NAG, EPO e MPO (Fig.19A-C) para mensuração indireta do recrutamento de leucócitos. Os resultados indicaram que não houve diferença na atividade de NAG (Fig.19A), como observado nos experimentos de padronização. Observamos um aumento de EPO no cérebro dos animais infectados em comparação aos controles Mock, mas que não foi diferente entre camundongos WT e ABR^{-/-} infectados (Fig.19B). Em relação à atividade de MPO, observamos um pequeno aumento nos cérebros de camundongos ABR^{-/-}. Para avaliação do dano tecidual recorremos a análise histológica dos cérebros dos camundongos envolvidos nos experimentos (Fig.19D-G). Cortes histológicos corados em H&E foram observados ao microscópio e indicaram que camundongos WT e ABR^{-/-} injetados com salina (Mock) apresentavam morfologia cerebral normal (Fig.19D, 19E). Camundongos infectados WT e ABR^{-/-} apresentaram meningite e ventriculite já ao terceiro dia p.i., como observado nos experimentos de padronização, e foram caracterizadas pela presença de leucócitos mononucleares (Fig.19F, 19G). A meningite causada por SLEV foi manifestada de forma similar entre os grupos WT e ABR^{-/-}.

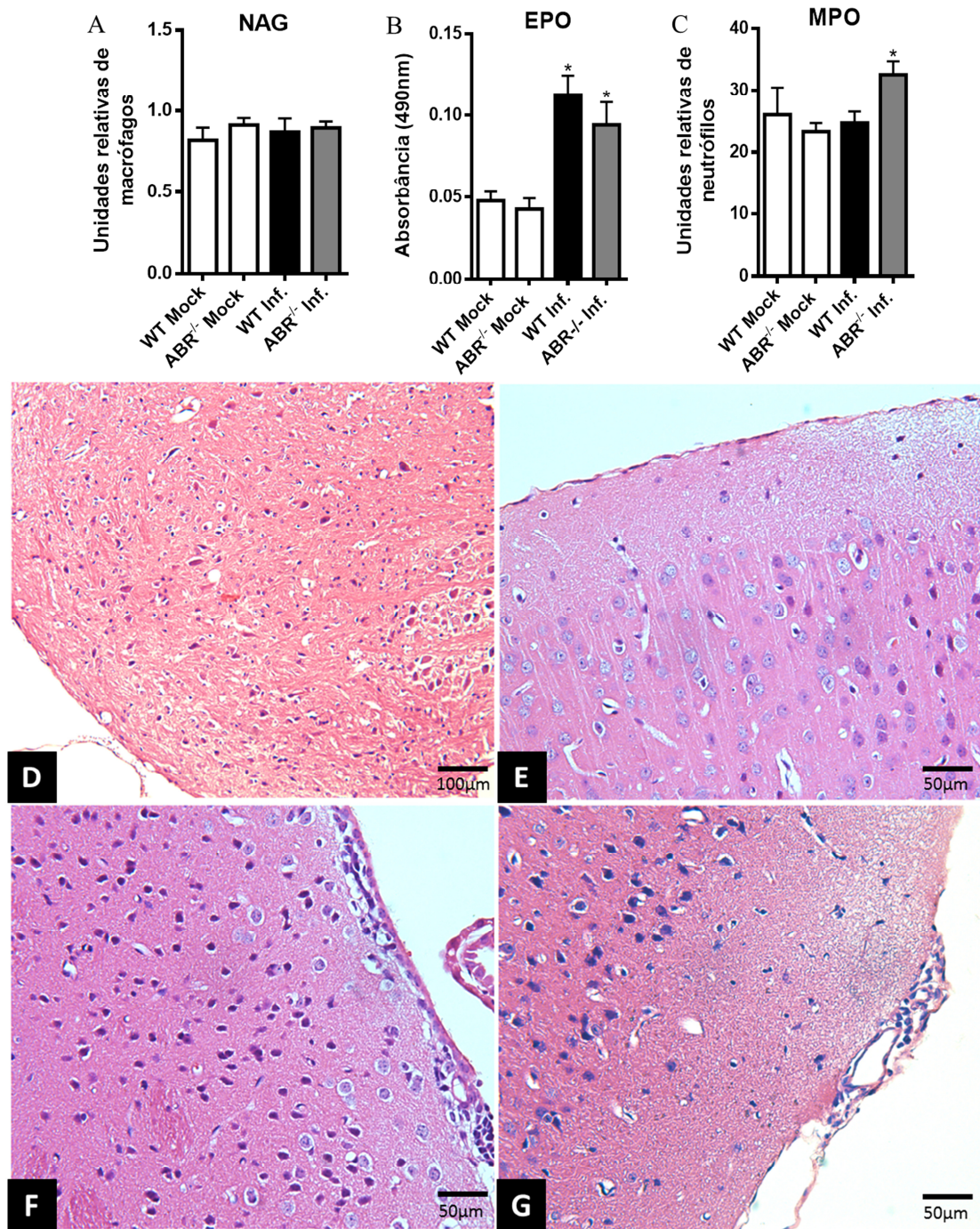


Figura 19 - Camundongos WT e ABR^{-/-} infectados com SLEV apresentam o mesmo grau de lesão tecidual no cérebro ao terceiro dia p.i.

Camundongos foram inoculados com 10^2 PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 3 p.i. para coleta de cérebro. Amostras de cérebro foram processadas e utilizadas em ensaios para detecção da atividade das enzimas NAG (A), EPO (B) e MPO (C). (D-G) Fotomicroscopia do encéfalo de camundongos WT Mock (D), ABR^{-/-} Mock (E), WT infectado (F) e ABR^{-/-} infectado (G), corados por H&E. Tronco encefálico (D) e cérebro (E) com aspecto histológico normal. Infiltração de células mononucleares na leptomeninge (meningite) (F, G). Aumento original: D 100x; E, F, G: 400x *P<0.05 relativo aos controles Mock. MPO= mieloperoxidase, NAG= n-acetil glucosaminidase, EPO= peroxidase eosinofílica, Mock= injetado com salina, Inf. = infectado.

A avaliação dos parâmetros de doença entre camundongos WT e ABR^{-/-} infectados por SLEV, ao terceiro dia p.i., mostrou que camundongos ABR^{-/-} possuem níveis elevados de citocinas no cérebro, que corroboram o aumento acelerado da carga viral encontrado nesses animais. No entanto, para parâmetros como contagem de leucócitos circulantes, recrutamento de leucócitos ao cérebro e dano tecidual, nenhuma diferença significativa foi observada entre grupos WT e ABR^{-/-} infectados. Portanto, outros mecanismos devem estar relacionados ao agravamento da infecção/ doença no contexto de deficiência em IFNs do tipo I, em adição à produção acelerada de citocinas pró-inflamatórias.

4.2.4. Camundongos ABR^{-/-} possuem alterações na atividade microglial e na ativação de caspase 3 na infecção por SLEV

Continuamos nossos estudos com a investigação de aspectos da resposta imune inata à infecção pelo SLEV. Especificamente, investigamos como a deficiência na resposta de IFNs do tipo I altera a resposta imune inata a SLEV no cérebro, e o envolvimento de populações de células residentes, como a micróglia. Cérebros murinos foram processados para a realização de técnicas histoquímicas para identificação e análise do grau de ativação da micróglia. Cortes de cérebro de animais injetados com salina ou com SLEV foram incubados com anticorpo anti-IBA-1 e observados ao microscópio.

A análise do córtex indicou que a técnica histoquímica foi realizada com sucesso, permitindo a observação de células com alto nível de expressão de IBA-1 e morfologia microglial (Fig.20 10X, 20X). A morfologia microglial nos cortes de cérebro de camundongos WT Mock é caracterizada por ramificações extensas e corpo celular pequeno (Fig.20, WT Mock 100X). Ao terceiro dia p.i., a micróglia de animais WT infectados já apresenta modificações, culminando na mudança morfológica observada ao sétimo dia de infecção, com células apresentando corpo celular maior e ramificações menores em extensão e mais grossas (Fig.20, WT Inf. Dia7, 100X). Esta mudança na morfologia é compatível com ativação microglial. As células IBA-1 positivas nos cérebros de camundongos ABR^{-/-} infectados apresentam fenótipo intermediário, comparável com as células encontradas nos cérebros de camundongos WT Mock e WT infectados ao dia 3 p.i. Outras regiões do cérebro, como a região CA1 e o giro denteado no hipocampo, foram analisadas em função da marcação e morfologia microglial e apontaram os mesmos resultados (dados não mostrados), indicando que o perfil de ativação da micróglia pode

estar alterado nos camundongos deficientes na resposta IFNs do tipo I em várias regiões do cérebro.

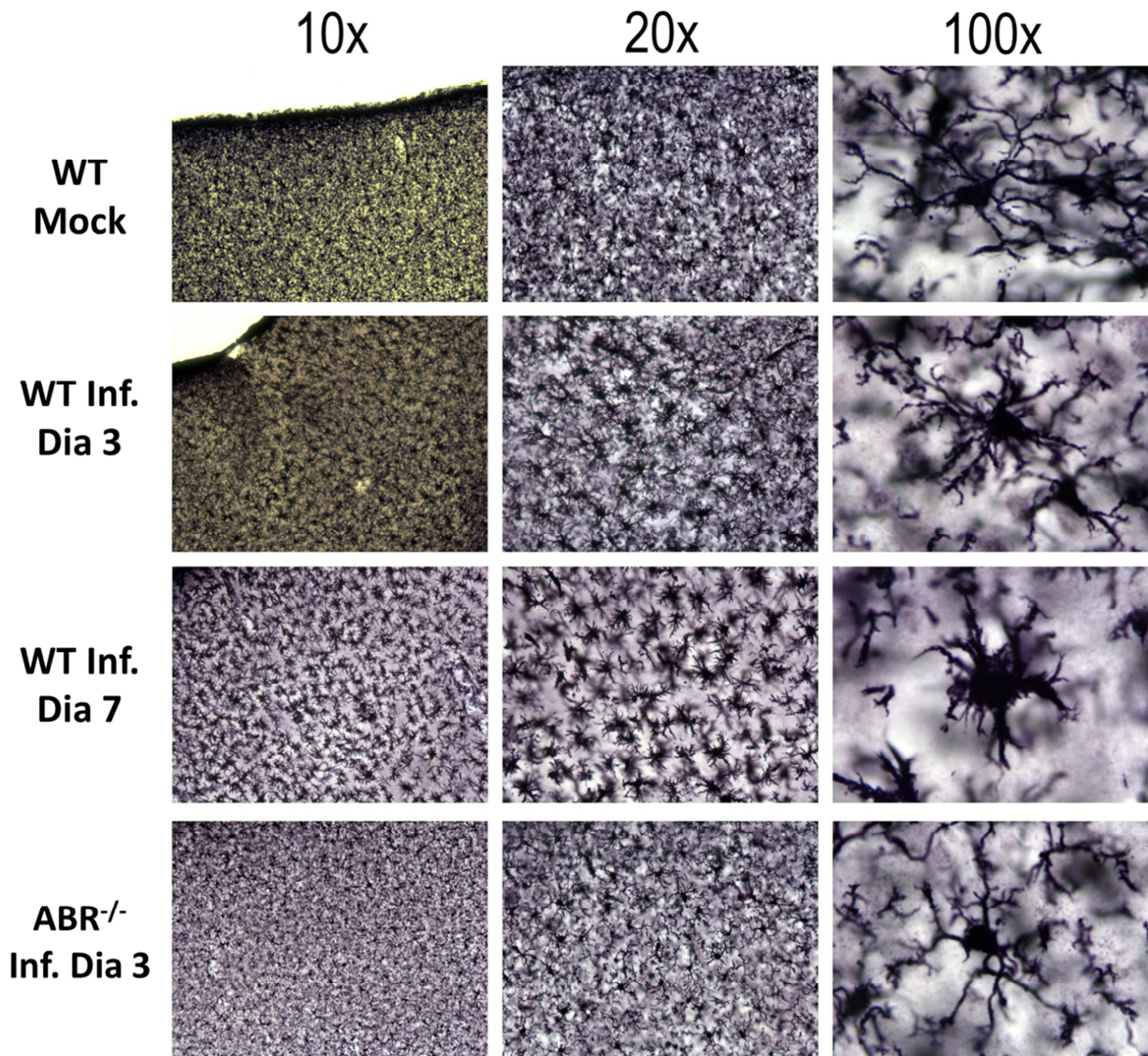


Figura 20 - A infecção por SLEV causa alteração da morfologia microglial

Camundongos foram inoculados com 10^2 PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 3 ou 7 p.i. para coleta de cérebro. Amostras de cérebro foram processadas para histologia e incubadas com anticorpo anti-IBA-1 para marcação de micróglia. Fotomicroscopias são representativas do córtex cerebral de camundongos WT Mock, WT infectado ao dias 3 e 7 p.i. e $ABR^{-/-}$ infectado ao dia 3 p.i. Magnificação da imagem está discriminada no topo da figura. Mock= injetado com salina, Inf. = infectado.

Em seguida, realizamos uma imunomarcção para caspase-3 ativada, com o objetivo de estudar uma caspase envolvida em ativação microglial e em outros aspectos do ciclo de vida celular (Fig.21). Cortes histológicos de cérebro foram novamente submetidos à técnica de marcação histoquímica com anticorpos e observados ao microscópio.

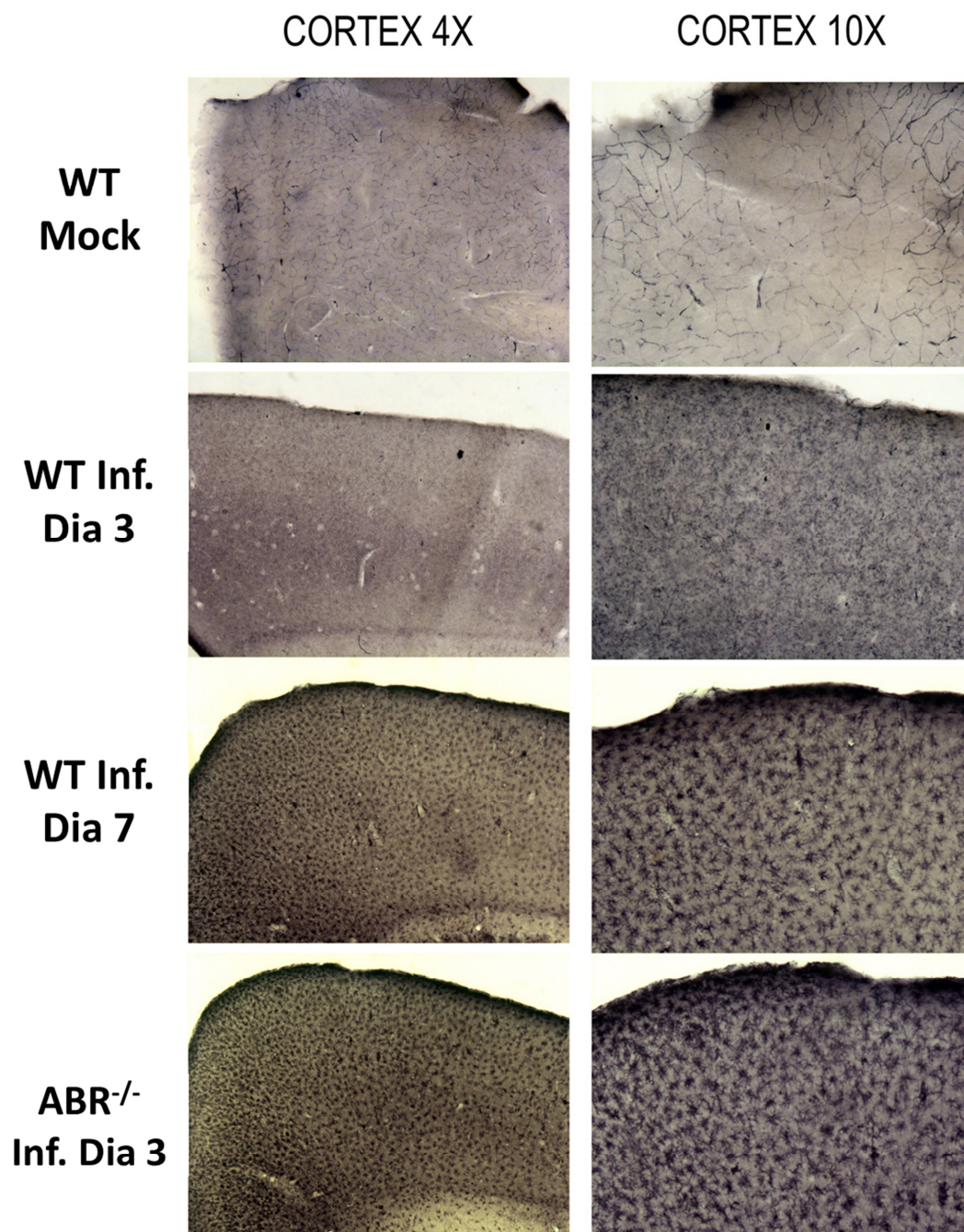


Figura 21 - A infecção por SLEV causa a ativação acelerada de caspase-3 no cérebro de camundongos ABR^{-/-}
 Camundongos foram inoculados com 10² PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 3 ou 7 p.i. para coleta de cérebro. Amostras de cérebro foram processadas para histologia e incubadas com anticorpo anti-caspase 3 ativada. Fotomicroscopias são representativas do córtex cerebral de camundongos WT Mock, WT infectado ao dias 3 e 7 p.i. e ABR^{-/-} infectado ao dia 3 p.i. Magnificação da imagem está discriminada no topo da figura. Mock= injetado com salina, Inf. = infectado.

Nossas análises mostraram que o cérebro de camundongos WT Mock não apresentaram qualquer tipo de marcação para caspase 3 ativada. Camundongos WT ao terceiro dia de infecção apresentam marcação para caspase 3 ativada, porém em baixa intensidade e com poucas células

marcadas. Ao sétimo dia de infecção, camundongos WT apresentam imunomarcagem numerosa e intensa, por toda a extensão do córtex cerebral (Fig.21, WT Inf. Dia 7, Córtex 10X). Camundongos ABR^{-/-} infectados também apresentaram uma forte marcação para caspase 3 ativada, de forma similar ao grupo WT Inf. dia 7 (Fig.21, ABR^{-/-} Inf. Dia 3, Córtex 10X). A maioria das células positivas para caspase 3 ativada nos grupos WT e ABR^{-/-} infectados apresentam morfologia microglial, porém células com morfologia neuronal também apresentaram sinal positivo, indicando que a ativação de caspase 3 pode ocorrer em diferentes tipos celulares. Novamente, as áreas hipocâmpais CA1 e giro denteado foram visualizadas e mostraram resultados consistentes com o observado no córtex (dados não mostrados), isto é, ativação de caspase 3 nos grupos WT e ABR^{-/-} infectados.

Sumarizando, a infecção por SLEV é capaz de causar a modificação da morfologia da micróglia, consistente com ativação microglial. A infecção por SLEV também induziu a ativação de caspase 3 no cérebro, uma molécula envolvida na ativação e apoptose celular. A micróglia de camundongos ABR^{-/-} infectados apresentou alterações morfológicas discretas, similares a camundongos WT ao terceiro dia p.i., porém a ativação de caspase 3 ocorreu de forma acelerada no cérebro de camundongos ABR^{-/-}, corroborando os dados de carga viral e mortalidade. Assim, esses dados indicam que a resposta imune a SLEV possui um importante componente inato, que envolve populações de células residentes no cérebro, e que está alterado em camundongos deficientes na resposta de IFNs do tipo I.

4.2.5. O aumento da replicação de SLEV em camundongos ABR^{-/-} está relacionado à baixa expressão de ISGs

Como mencionado na introdução, IFNs do tipo I exercem seus efeitos antivirais ao se ligarem nos seus receptores, causando a mobilização de efetores intracelulares e resultando na expressão de ISGs, que são as moléculas que medeiam o controle da replicação viral. Baseados nas observações que a resposta imune inata ao SLEV está alterada nos cérebros de camundongos ABR^{-/-}, decidimos avaliar a função de ISGs no contexto da infecção. Para tal, infectamos camundongos WT e ABR^{-/-} com 10² PFU de SLEV e coletamos amostras de cérebro aos dias 1, 2 e 3 p.i., com o objetivo de estudar a replicação de SLEV em maior detalhe. Camundongos WT e ABR^{-/-} inoculados com salina (Mock) foram incluídos no experimento. Amostras de cérebro foram processadas e submetidas ao ensaio de titulação em placa para mensuração da carga viral e

confirmaram que SLEV se replica mais rápido nos cérebros de camundongos $ABR^{-/-}$ do que nos cérebros de camundongos WT (Fig.22A). O experimento permitiu observar que partículas virais viáveis e infectivas de SLEV são detectáveis já ao primeiro dia p.i. nos cérebros de camundongos $ABR^{-/-}$, sendo que ao terceiro dia p.i. o grupo WT ainda apresenta amostras negativas para SLEV. A mediana da carga viral do grupo $ABR^{-/-}$ aumenta 100x entre os dias 1 e 2 p.i., e 1000x entre os dias 2 e 3 p.i., resultando em impressionantes 10^7 PFU por 100mg de cérebro em camundongos $ABR^{-/-}$, enquanto SLEV demoraria pelo menos mais 96 horas para igualar essa carga viral no cérebro de camundongos WT.

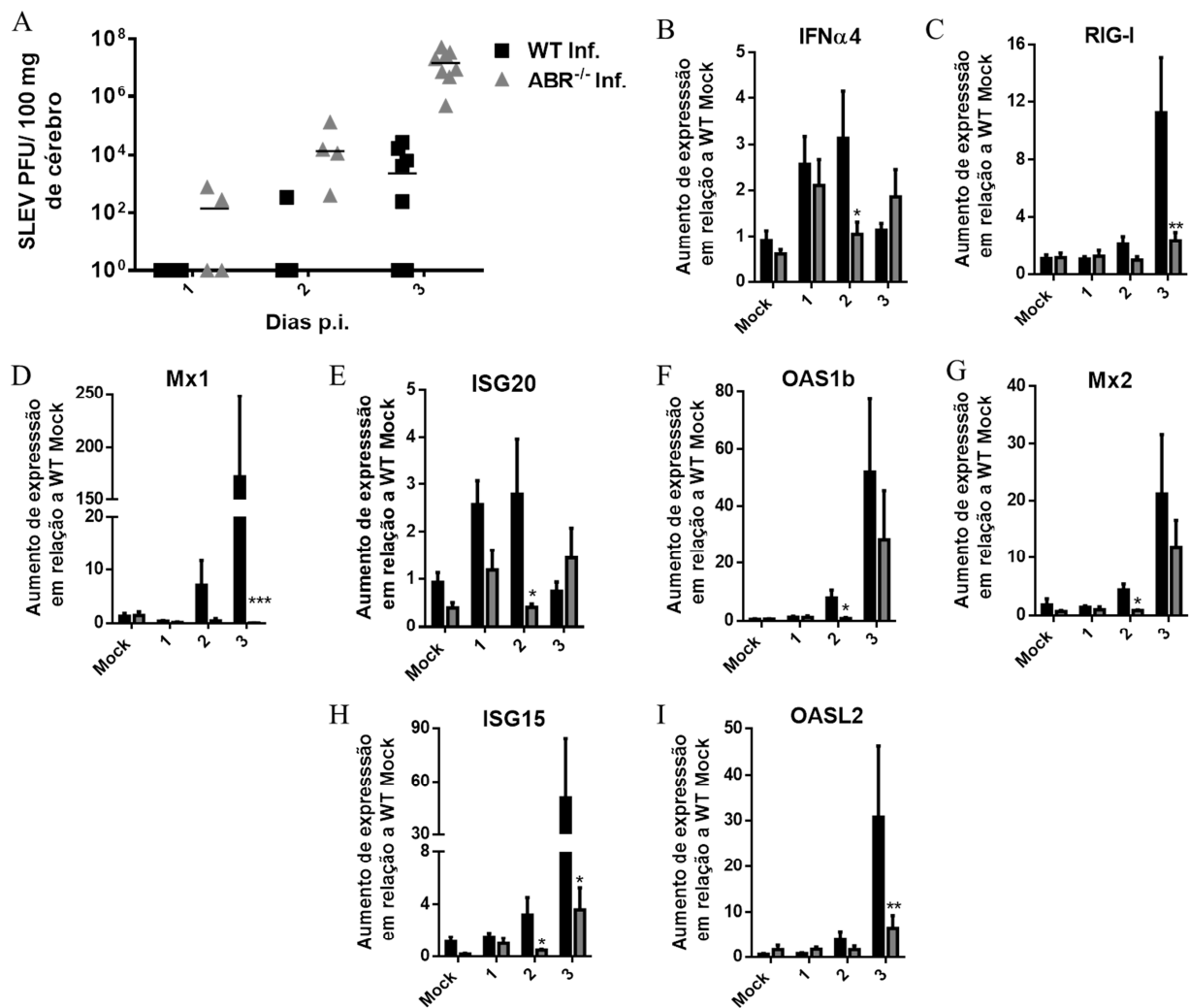


Figura 22 - O aumento da replicação de SLEV está relacionado à baixa expressão de ISGs em camundongos $ABR^{-/-}$
 Camundongos foram inoculados com 10^2 PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados aos dia 1, 2 e 3 p.i. para coleta de cérebro. Amostras foram processadas, tituladas para mensuração da carga viral (A) e submetidas a ensaios de RT-qPCR para mensurar a expressão de $IFN\alpha4$ (B) ou de ISGs (C-I). Resultados são expressos como aumento de expressão relativo ao controle Mock e são representativos de dois experimentos. Mock= injetado com salina, Inf. = infectado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ relativo ao grupo WT inf.

Utilizamos as amostras de cérebros para executar um painel de expressão de ISGs, por RT-qPCR (Fig.19). O painel é acompanhado de dados de expressão de IFN α 4 (Fig.22B), considerando que a expressão de IFNs tipo I é necessária à indução de ISGs e que SLEV induz a expressão de IFNs do tipo I *in vivo* (Fig. 9). Nossos dados mostram que a infecção por SLEV induz um aumento moderado na expressão de IFN α 4 em cérebros WT infectados aos dias 1 e 2 p.i. (Fig.22B). Esse aumento de expressão de IFN α 4 não é observado em cérebros de camundongos ABR^{-/-} no dia 2 p.i. Esses resultados corroboram os resultados obtidos nos experimentos de padronização (Fig.9), onde a expressão máxima de IFNs tipo I ocorre no pico da infecção, ao sétimo dia p.i. A expressão da maioria dos ISGs estudados (Fig.22C-I) foi crescente ao longo dos três dias de infecção nos cérebros de camundongos WT infectados, chegando ao pico de expressão ao terceiro dia p.i. Nos animais WT infectados, o pico de expressão da maioria dos ISGs é posterior ao pico de expressão de IFN α 4, que acontece ao segundo dia p.i. Os picos de expressão mais significativos foram observados nos ISGs Mx1 (Fig.22D) e ISG15 (Fig.22H), aumentados aproximadamente 150X e 50X sobre o grupo controle Mock, respectivamente. ISG20 foi o único ISG estudado a ter um perfil de expressão similar ao de IFN α 4, mostrando aumento nos dias 1 e 2 p.i. e sem o aumento de expressão tipicamente observado ao dia 3 p.i. (Fig.22E).

A análise da expressão de ISGs no cérebro de camundongos ABR^{-/-} mostrou que alguns ISGs não tem sua expressão aumentada ou tem expressão alterada ao longo da infecção pelo SLEV. Camundongos ABR^{-/-} infectados apresentaram expressão basal dos genes RIG-I (Fig.22C) e Mx1 (Fig.22D) ao dia 3 p.i., enquanto a expressão desses ISGs se encontra aumentada em pelo menos uma ordem de grandeza no cérebro de camundongos WT infectados. A expressão dos ISGs OAS1b, Mx1 e ISG15 (Fig.22F-H) no cérebro de ABR^{-/-} infectados é estatisticamente menor que a expressão em WT infectados ao dia 2 p.i. Ao dia 3 p.i., a expressão de OAS1b, Mx2 e ISG15 é aumentada no cérebro de camundongos ABR^{-/-}, mas a expressão ISG15 permanece reduzida em comparação ao grupo WT (Fig.22H). Por fim, a expressão de OASL2 também se mostrou reduzida em cérebros ABR^{-/-} em comparação a cérebros WT infectados ao terceiro dia p.i. (Fig. 22G).

Sumarizando, nossos dados indicam que SLEV induz a expressão de ISGs nos cérebros de camundongos WT infectados, e que esse aumento é precedido por um aumento de expressão

de IFN do tipo I (IFN α 4). Camundongos ABR^{-/-} possuem uma resposta de ISGs deficiente, no sentido que a expressão de ISGs não é aumentada no contexto de infecção pelo SLEV, ou é reduzida em relação ao grupo WT. Essa resposta de ISGs deficiente corrobora o aumento da carga viral nos tecidos de camundongos ABR^{-/-}, sugerindo um mecanismo pelo qual camundongos deficientes em IFN tipo I apresentam agravamento da infecção experimental por SLEV. RIG-I, em função de seus papéis no controle de infecções por flavivirus, pode ser uma das principais moléculas envolvidas na resposta de IFNs do tipo I neste modelo experimental.

Estes dados finalizam a seção 4.2 de resultados, caracterizando o papel da resposta de IFNs do tipo I no contexto da infecção pelo SLEV em camundongos. Sumarizando, a deficiência nos receptores de IFNs do tipo I resulta na falha catastrófica do hospedeiro em controlar a infecção. A replicação viral exacerbada resulta na produção precoce de citocinas e na morte rápida do hospedeiro, mas precede o acúmulo de leucócitos no cérebro. A resposta imune inata aparenta ser essencial, pois SLEV induz a ativação de populações residentes no cérebro, a produção de IFNs do tipo I e a expressão de ISGs, mecanismos que se encontram ineficientes na ausência dos receptores de IFNs tipo I. As seções seguintes tratam dos papéis de IFNs tipo II e, brevemente, de IFN do tipo III na infecção por SLEV em camundongos.

4.3. Estudo dos papéis dos IFNs no modelo murino de encefalite de St. Louis – IFNs do tipo II

4.3.1. Camundongos IFN γ ^{-/-} possuem carga viral reduzida no cérebro em comparação a camundongos WT, porém não apresentam redução na produção de citocinas

Em continuidade aos estudos dos diferentes papéis dos IFNs na encefalite de St. Louis, decidimos por investigar o fenótipo de resistência moderada à infecção apresentado por animais IFN γ ^{-/-} (Fig.16B). Camundongos WT e IFN γ ^{-/-} foram inoculados com 10¹ PFU de SLEV para coleta de amostras ao sétimo dia p.i. Nossa análise se iniciou com a mensuração da carga viral nos cérebros, pela técnica de ensaio de placa (Fig.23A). Os resultados indicam que camundongos IFN γ ^{-/-} infectados possuem uma menor carga viral no cérebro em comparação com camundongos WT infectados. A mediana da carga viral indica uma redução de aproximadamente 70% na carga de SLEV em relação ao grupo WT. Como esperado, camundongos injetados com salina não apresentam SLEV detectável no cérebro.

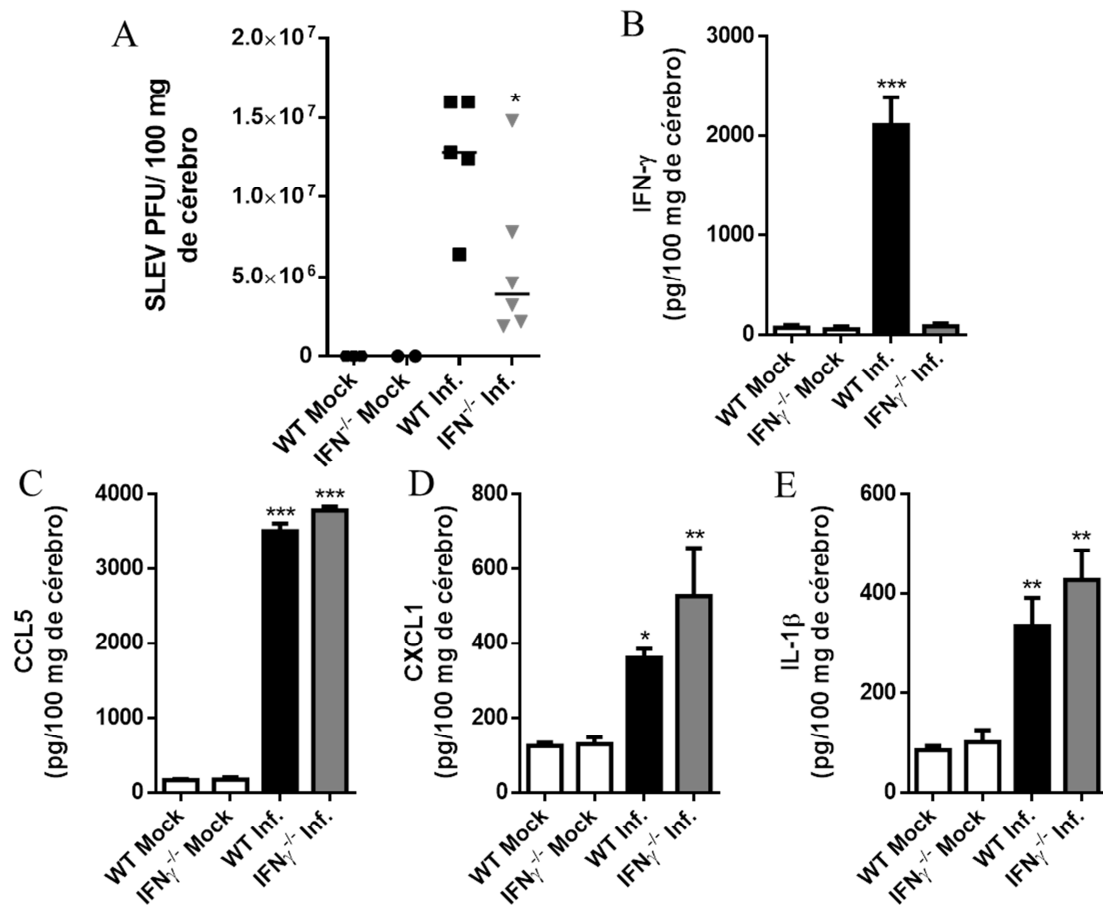


Figura 23 - Camundongos IFN γ ^{-/-} acumulam menos vírus no cérebro ao longo da infecção pelo SLEV, mas não apresentam mudanças na produção de citocinas pró-inflamatórias

Camundongos foram inoculados com 10¹ PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 7 p.i. para coleta de cérebro. (A) A carga viral foi mensurada nas amostras por meio de ensaio de placa e resultados expressos em PFU/100 mg de cérebro. (B-E) Níveis de citocinas no cérebro foram mensurados por ELISA e expressos em pg por 100 mg de tecido. Mock= injetado com salina, Inf.= infectado. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 relativos aos respectivos controles Mock, ou ao grupo WT inf. (A). Dados de carga viral são representativos de 1 experimento. Demais dados são representativos de 2-3 experimentos.

Em seguida, investigamos se a carga viral reduzida também acarretaria em redução na produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro dos animais IFN γ ^{-/-} ao sétimo dia p.i., com base nos dados prévios de padronização e no estudo de IFNs tipo I. Os níveis de IFN γ se encontravam muito aumentados nos cérebros de camundongos WT em relação ao respectivo controle Mock, que apresentou níveis basais de expressão da citocina, como esperado (Fig.23B). Camundongos IFN γ ^{-/-} Mock ou infectados com SLEV não expressaram IFN γ , corroborando a condição de deficiência em IFN γ . Os níveis das citocinas CCL5, CXCL1 e IL1 β (Fig.23C-E) também foram mensurados e indicaram que camundongos WT e IFN γ ^{-/-} infectados apresentam um aumento na produção dessas citocinas no cérebro, ao sétimo dia p.i., em comparação com os respectivos controles Mock. Não observamos diferença estatística entre os grupos infectados,

apesar de uma tendência ao aumento dos níveis de CXCL1 e IL1 β no cérebro de camundongos IFN γ ^{-/-}.

Esses achados indicam que no contexto de deficiência de IFN γ , camundongos apresentam carga viral reduzida no cérebro, que corrobora o aumento moderado na sobrevivência dos animais frente à infecção pelo SLEV. No entanto, a redução na carga viral não é acompanhada por uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro.

4.3.2. Camundongos IFN γ ^{-/-} apresentam recrutamento de macrófagos/micróglia ao cérebro infectado

Continuamos o estudo do fenótipo de camundongo IFN γ ^{-/-} com a análise das alterações hematológicas provocadas por SLEV. Amostras de sangue foram coletadas de camundongos WT e IFN γ ^{-/-} injetados com salina (Mock) ou infectados com SLEV (10¹ PFU por animal) ao sétimo dia p.i., para contagem total e diferencial de leucócitos (Fig.24A, 24B). Os resultados de contagem total indicaram que camundongos IFN γ ^{-/-} possuem uma contagem média de leucócitos maior do que a contagem média de camundongos WT, sob condições normais (Fig.24A). Ambos os grupos infectados apresentaram queda na contagem total de leucócitos ao sétimo dia p.i., como esperado. Ainda, a leucopenia apresentada por camundongos infectados foi novamente devida à linfopenia, em função da queda marcante no número/ proporção de linfócitos circulantes ao sétimo dia p.i. (Fig. 24B). De forma similar à contagem total, camundongos IFN γ ^{-/-} possuem uma contagem média de linfócitos maior que camundongos WT sob condições normais, tornando a linfopenia proporcionalmente mais intensa no grupo IFN γ ^{-/-} infectado.

Em seguida comparamos o recrutamento de leucócitos ao cérebro dos camundongos WT e IFN γ ^{-/-} no pico da infecção por SLEV (Fig.24C-E). Em relação ao recrutamento de macrófagos/ micróglia, medido pela atividade de NAG no cérebro, camundongos WT Mock e WT infectados apresentaram níveis idênticos ao sétimo dia p.i. (Fig.24C), indicando que SLEV não altera essas populações no cérebro de camundongos WT neste momento da infecção. Em contraste, camundongos IFN γ ^{-/-} Mock apresentam atividade de NAG reduzida em condições basais, de forma que, ao sétimo dia de infecção, camundongos IFN γ ^{-/-} infectados apresentam um aumento significativo na atividade de NAG no cérebro (Fig.24C). Em relação ao recrutamento de neutrófilos, medido pela atividade de MPO, camundongos WT e IFN γ ^{-/-} apresentaram um

aumento similar em relação aos respectivos controles Mock, indicando que neutrófilos são recrutados ao cérebro e que esse recrutamento é idêntico entre os grupos infectados (Fig.24D). Por fim, a atividade de EPO, referente ao recrutamento de eosinófilos, não mostrou diferenças entre grupos Mock e infectados, e tampouco entre camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$, indicando que eosinófilos não participam nesta fase da infecção por SLEV (Fig.24E).

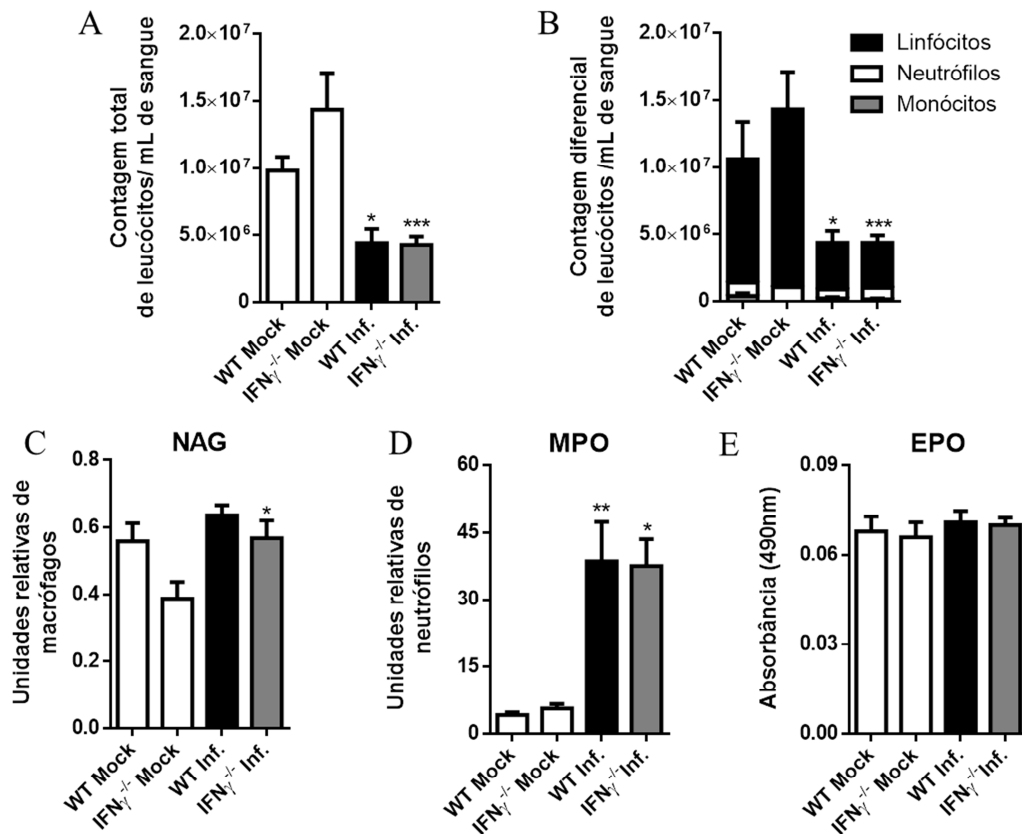


Figura 24 - Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ infectados apresentam recrutamento de macrófagos/micróglia ao cérebro

Camundongos foram inoculados com 10^1 PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 7 p.i. para coleta de cérebro e sangue. (A-B) Contagens total e diferencial dos leucócitos circulantes, expressas em contagem por mL de sangue. Amostras de cérebro foram processadas e utilizadas em ensaios para detecção da atividade das enzimas NAG (C), MPO (D) e EPO (E). Mock= injetado com saline, Inf.= infectado. (A-D) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ relativos os respectivos controles Mock.

Sumarizando, a análise de parâmetros hematológicos e recrutamento de leucócitos ao cérebro de camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ mostrou que o fenótipo de proteção apresentado por camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ não se explica por alterações hematológicas ou pelo recrutamento diferencial de neutrófilos e eosinófilos. A infecção por SLEV causou alterações no recrutamento de macrófagos/ micróglia no cérebro de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$, porém a contribuição dessas populações ao fenótipo de resistência de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ é desconhecida.

4.3.3. Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ apresentam expressão alterada de ISGs no pico da infecção por SLEV

Devido à diminuição na carga viral nos cérebros de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ infectados por SLEV, investigamos se a expressão de IFNs tipo I ou de ISGs poderia estar envolvida. Amostras de cérebro de camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ foram processadas e submetidas a reações de RT-qPCR para mensuração da expressão de $IFN\alpha 4$ e dos ISGs previamente estudados, ao sétimo dia p.i. (Fig.25). Nossos resultados mostraram que a expressão de $IFN\alpha 4$ e ISGs nos cérebros de camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ infectados difere muito do perfil observado nos experimentos envolvendo camundongos $ABR^{-/-}$ (Fig.22). Em relação à expressão de $IFN\alpha 4$, ambos os grupos de camundongos infectados mostraram aumento na expressão do gene ao sétimo dia p.i., em comparação com os respectivos controles injetados com salina (Mock) (Fig.25A). Não foram observadas diferenças na expressão de $IFN\alpha 4$ entre os grupos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ infectados, indicando que a deficiência em $IFN\gamma$ não afeta a produção deste IFN tipo I induzida por SLEV no cérebro.

O estudo de expressão dos ISGs indicou que ISG20 (Fig.25B) é induzido ao sétimo dia de infecção no cérebro de camundongos WT, porém essa indução é inexistente no grupo $IFN\gamma^{-/-}$ infectado, que apresentou níveis de expressão similares aos controles Mock. A avaliação da expressão de RIG-I nos cérebros revelou um resultado inesperado, indicando que camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ Mock expressam mais RIG-I do que camundongos WT Mock (Fig.25E). Animais WT infectados apresentam um aumento na expressão de RIG-I em relação ao respectivo controle Mock, sendo que animais $IFN\gamma^{-/-}$ mantêm os níveis já elevados de expressão no período avaliado. A expressão de ISG15 foi detectada nos cérebros avaliados e mostra uma tendência ao aumento em cérebros de camundongos infectados por SLEV, mas que não foi confirmada pela análise estatística (Fig.25F). A expressão dos ISGs Mx1, Mx2 e OASL2 (Fig.25C, G, H) não foi detectada no cérebro dos camundongos estudados. A expressão do ISG OAS1b foi detectada, mas não apontou diferenças entre camundongos Mock e infectados, WT ou deficientes em $IFN\gamma$ (Fig.25D).

Por fim, nossos dados indicaram que camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ produzem IFN do tipo I de forma similar no cérebro, ao pico da infecção por SLEV. Apesar da relação entre IFNs do tipo I e a indução de ISGs, camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ apresentam expressão alterada de ISGs no cérebro no contexto de infecção pelo SLEV, exemplificado pela ausência de expressão de ISG20.

Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ apresentam elevada expressão de RIG-I no cérebro em condições basais e mantêm a expressão no pico da infecção, algo que pode estar relacionado à redução na carga de SLEV observada neste tecido.

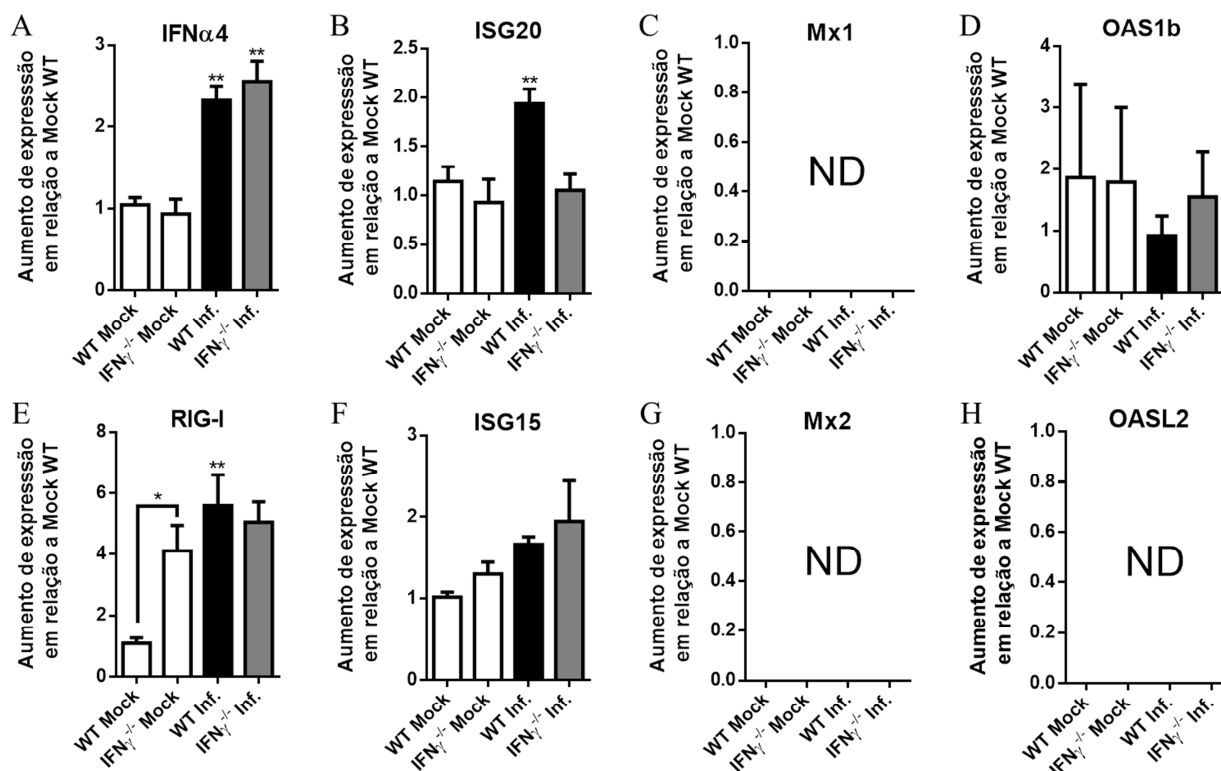


Figura 25 - Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ apresentam expressão basal de RIG-I aumentada no cérebro, que é mantida na infecção pelo SLEV

Camundongos foram inoculados com 10^1 PFU de SLEV pela via i.c. e eutanasiados ao dia 7 p.i. para coleta de cérebro. Amostras foram processadas e submetidas a ensaios de RT-qPCR para mensurar a expressão de $IFN\alpha 4$ (A) ou de ISGs (B-H). Resultados são expressos como aumento de expressão relativo ao controle Mock WT e são representativos de dois experimentos. Mock= injetado com salina, Inf. = infectado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ relativo ao respectivo controle Mock ou referente ao grupo indicado (E).

Estes dados finalizam a seção 4.3 de resultados, caracterizando o papel de IFNs tipo II no contexto da infecção pelo SLEV em camundongos. De forma inesperada, a deficiência em $IFN\gamma$ é benéfica ao hospedeiro, levando ao aumento moderado da sobrevivência após a infecção com SLEV. A replicação viral é reduzida no cérebro de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$, algo que é independente da produção das citocinas avaliadas, do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos e da produção de $IFN\alpha 4$. A deficiência em $IFN\gamma$ leva ao aumento da expressão de RIG-I no cérebro, novamente remetendo ao possível papel deste PRR no controle de infecções por flavivirus, especificamente de SLEV. A seção seguinte trata da mensuração de IFNs do tipo III na infecção por SLEV em camundongos.

4.4. SLEV induz a expressão de IFNs do tipo III exclusivamente no cérebro de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$.

Por fim, encerramos a seção de resultados com dados sobre a participação de IFN do tipo III neste modelo experimental de encefalite de St. Louis. A única ferramenta que dispomos para estudar IFNs do tipo III é uma reação de RT-qPCR que mensura a expressão de $IFN\lambda 2$ e $\lambda 3$ simultaneamente. Utilizando amostras oriundas de experimentos realizados com camundongos $ABR^{-/-}$, $IFN\gamma^{-/-}$ e seus respectivos controles, realizamos as reações de RT-qPCR para testar se a infecção por SLEV induz a expressão de $IFN\lambda 2/3$ no cérebro (Fig.26).

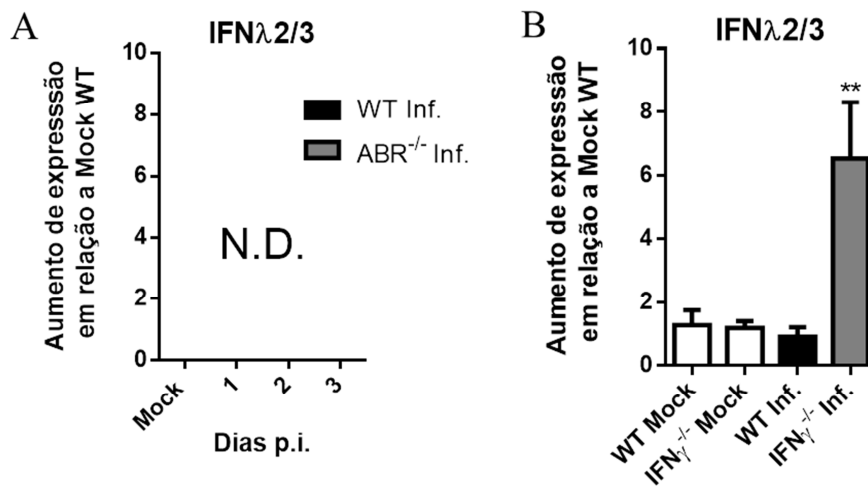


Figura 26 - SLEV induz a expressão de IFNs do tipo III exclusivamente no cérebro de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$
Camundongos foram inoculados com 10^2 PFU (A) ou 10^1 PFU (B) de SLEV pela via i.c. e eutanasiados aos dias 1, 2 e 3 p.i. (A) ou ao dia 7 p.i. (B), para coleta de cérebro. Amostras foram processadas e submetidas a ensaios de RT-qPCR para mensurar a expressão de $IFN\lambda 2/3$. Resultados são expressos como aumento de expressão relativo ao controle Mock (WT) e são representativos de dois experimentos. Mock= injetado com salina, Inf. = infectado, N.D.= não detectável. ** $P < 0.01$ relativo ao respectivo grupo Mock.

Os resultados indicam que camundongos WT (SV129) ou $ABR^{-/-}$, injetados com salina ou infectados, não expressam $IFN\lambda 2/3$ no cérebro em nenhum dos tempos avaliados (Fig. 26A). O teste de amostras de cérebro de camundongos WT (C57BL/6) e $IFN\gamma^{-/-}$ ao sétimo dia p.i. também indicou que $IFN\lambda 2/3$ não são induzidos em cérebros de camundongos Mock, tampouco no cérebro de camundongos WT infectados (Fig.26B). Em contraste, camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ infectados apresentam um aumento significativo na expressão de $IFN\lambda 2/3$, sendo o único grupo experimental a apresentar tal resultado. Portanto, nossos dados indicam que SLEV só é capaz de induzir a expressão de IFNs do tipo III no cérebro no contexto de deficiência em IFN do tipo II.

O mecanismo pelo qual camundongos $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ infectados são capazes de expressar $\text{IFN}\lambda 2/3$ não foi investigado.

5. Discussão

A encefalite de St. Louis é uma doença que pode levar a sérias complicações neurológicas. A presença de SLEV e de mosquitos vetores no Brasil representa um risco à população, em adição ao risco de contrair outras doenças causadas por flavivirus, como dengue, febre amarela e zika.

A habilidade que os flavivirus têm de emergir e reemergir em diferentes regiões do mundo torna necessário o desenvolvimento de ferramentas para controle de infecções por vírus pertencentes a esse gênero, tais como vacinas e tratamentos. Vacinas são importantes para prevenção e controle de surtos e epidemias, porém o caráter imprevisível de expansão de flavivirus, a exemplo da dengue na década de 1980 e de zika na década atual, torna difícil seu desenvolvimento e aplicação. Existem dezenas de flavivirus capazes de causar doenças em humanos e o desenvolvimento de vacinas para todos os vírus é impraticável e, aliado a isso, a baixa incidência das doenças causadas pela maioria dos flavivirus dificulta a realização de testes clínicos. Atualmente, a estratégia escolhida por grupos de pesquisa, empresas, agências de fomento e organizações envolvidas em saúde pública é desenvolver vacinas a partir da emergência ou reemergência de flavivirus, tais como contra os vírus da dengue e o vírus Zika. Metodologias como a tecnologia Chimerivax® permitem a criação de vacinas em poucos meses, mas aspectos burocráticos e a necessidade de testes clínicos podem atrasar a chegada de tais vacinas ao mercado em mais uma década. Da mesma forma, o desenvolvimento de novos tratamentos pode demorar tanto quanto vacinas para finalmente atingir o mercado. No entanto, compostos que se encontram no mercado para tratamento de infecções por vírus de RNA já foram estudados e aprovados por agências regulatórias, podendo ser estudados e redesignados para uso contra infecções por flavivirus, permitindo intervenção rápida em situações de emergência epidemiológica. Vacinas são desenvolvidas com especificidade para um patógeno em questão, o que impossibilita sua aplicação no contexto de outras infecções. Em contrapartida, tratamentos desenvolvidos para flavivirus envolvidos em epidemias na atualidade, novamente dengue e zika, podem ser eficazes contra outros flavivirus. Análogos de nucleosídeos são compostos antivirais eficazes, que interferem na replicação de flavivirus via interação com a polimerase NS5, que é extremamente conservada e similar dentre os flavivirus. Dessa forma, o desenvolvimento de tratamentos contra infecções por flavivirus deve ser priorizado.

Modelos animais de infecção são ótimas ferramentas de estudo de infecções virais, especialmente por flavivirus, e permitem a investigação de mecanismos de doença e resistência à infecção. O delineamento de mecanismos de doença e resistência à infecção é chave para a criação de estratégias terapêuticas de sucesso ao designar mecanismos alvo no vírus ou no hospedeiro que possam ser modulados de forma benéfica ao hospedeiro. O desenvolvimento do modelo de encefalite de St. Louis apresentado nesta tese buscou suprir a demanda por modelos animais de viroses negligenciadas, a fim de permitir a investigação de tais mecanismos de doença e resistência e propiciar o conhecimento necessário ao desenvolvimento de futuros tratamentos.

Em relação ao desenvolvimento do modelo em camundongos, algumas decisões importantes foram tomadas, a fim de priorizar o objetivo de estudar mecanismos de doença e resistência à infecção. A linhagem de SLEV utilizada, BeH 355964, foi escolhida por se tratar de um isolado clínico obtido de uma paciente brasileira sintomática, e por ter sido utilizada em diferentes estudos, frequentemente como linhagem SLEV de referência, desde seu isolamento na década de 1970. Outras linhagens de SLEV estavam disponíveis (ver [12]), porém haviam sido isoladas de outros hospedeiros vertebrados ou de artrópodes, sem qualquer associação com a doença em humanos, e se encontravam em estado de caracterização mínimo. Nosso grupo de pesquisa conduziu o sequenciamento completo da linhagem BeH 355964 com objetivo de continuar a caracterização da linhagem, resultando em uma publicação envolvendo estudos filogenéticos realizados com outras linhagens de SLEV [11]. BeH 355964 apresentou um alto grau de similaridade para com as linhagens brasileiras BeAn 246262, BeAr 23379 e BeAn 247377. Todas as quatro linhagens foram isoladas na região norte do Brasil, porém foram isoladas em anos diferentes (1960-1978) e de diferentes hospedeiros, incluindo o homem, marsupiais, mosquitos e aves, sendo que não há correlação entre a identidade filogenética e o hospedeiro do qual a linhagem foi isolada. Ainda, nossos achados têm implicações epidemiológicas sobre a circulação de SLEV entre o Brasil e as Américas Central e Norte, em função do alto grau de similaridade entre linhagens obtidas das diferentes localidades. De forma geral, a iniciativa de sequenciar o genoma de SLEV BeH 355964 excedeu nossas expectativas em função da qualidade e aplicabilidade da informação gerada.

A obtenção de dados preliminares, mostrando a capacidade de SLEV BeH 355964 em causar mortalidade em camundongos quando inoculado via i.c. (Fig. 6, 7), definiu o uso de BeH 355964 como a linhagem de vírus do nosso modelo experimental. Em seguida, cientes de que BeH não causou encefalite em camundongos adultos quando injetado por vias periféricas, nos deparamos com as opções de utilizar camundongos deficientes ou jovens, que são susceptíveis o suficiente para o desenvolvimento de doença após inoculação periférica. Apesar do uso de vias periféricas de infecção ser desejável, pois mimetizam fases iniciais de infecção por flavivirus, ambas as alternativas foram descartadas. A utilização de camundongos adultos e imunocompetentes é essencial ao estudo de respostas imunes e inflamação, que estão diretamente envolvidas na resistência/ susceptibilidade do hospedeiro à infecção. Em situações de deficiência ou imaturidade fisiológica, respostas imunes e inflamação são naturalmente enviesadas. Além disso, o modelo foi concebido para estudo da doença grave, a encefalite, que ocorre com a chegada de SLEV ao CNS, e modelada com a inoculação direta de SLEV no cérebro. Neste sentido, nosso modelo é ideal para o estudo da encefalite, da contribuição de fatores do hospedeiro ao desenvolvimento de doença grave e do teste de fármacos, mas não das fases iniciais da infecção, na pele e linfonodos, e nem da disseminação do vírus ao cérebro, atravessando a BBB.

O estudo da doença causada por SLEV em camundongos mostrou que SLEV causa encefalite aguda, caracterizada por replicação viral, recrutamento de leucócitos, produção de citocinas e dano tecidual. Esta apresentação de doença corrobora a apresentação da encefalite de St. Louis em humanos. O pico da mortalidade p.i. está associado ao pico da encefalite, de forma que a mortalidade, a replicação viral e a inflamação estão associadas (Fig.8). A patogênese da encefalite neste modelo está vinculada à replicação do vírus, porém a contribuição da resposta imune do hospedeiro à patogênese não é clara. Respostas imunes e inflamação são importantes para o hospedeiro, mas podem contribuir para imunopatogênese quando descontroladas e/ou em excesso. De fato, camundongos infectados apresentam cargas virais significativas no cérebro já ao terceiro e quinto dia p.i., período no qual parâmetros de doença estão pouco alterados ou em desenvolvimento, e camundongos infectados não aparentam estar doentes. A produção de IFN γ , por exemplo, aumenta somente ao pico da infecção, o que indicava que esta citocina poderia contribuir para o agravamento da doença. Outras citocinas, como CCL5, CXCL1 e IL1 β também atingem níveis extraordinários em cérebros infectados, onde podem contribuir a dano tecidual ao

invés de controlar a infecção. A produção das citocinas avaliadas foi realizada com o objetivo de evidenciar a ocorrência de inflamação, e nunca haviam sido mensuradas no contexto da encefalite de St. Louis. No entanto, os papéis individuais de cada citocina mensurada, à exceção dos IFNs, ainda necessitam de estudo, seja na doença humana ou no modelo experimental. A associação da produção de quimiocinas e da entrada de leucócitos ao cérebro sugere que CCL5 e CXCL1 participam no recrutamento das populações de leucócitos estudadas. IL1 β , IL-6 e TNF α podem desempenhar importantes papéis na infecção, ao estimular células residentes no cérebro, como astrócitos, micróglia e neurônios [154].

Em relação às dinâmicas de leucócitos durante a infecção por SLEV, a leucopenia caracterizada por linfopenia foi um dos achados mais consistentes ao longo dos experimentos realizados (Fig.10). Nós hipotetizamos que a diminuição na contagem de linfócitos no sangue se daria pelo recrutamento de linfócitos ao cérebro. A análise histológica corroborou nossa hipótese, indicando que linfócitos são recrutados ao dia 3 p.i. e se acumulam na interface do córtex cerebral e meninges (Fig. 12). No entanto, o aumento na produção de quimiocinas no cérebro e os dados de citometria de fluxo (Fig.11) indicam recrutamento de linfócitos somente ao quinto dia p.i. Isso mostra a importância e sensibilidade de técnicas histológicas para a caracterização de inflamação, em comparação com as técnicas de ELISA e citometria de fluxo, e sugere que outras quimiocinas podem estar envolvidas no recrutamento de linfócitos neste modelo. Apesar de nossos dados apontarem um importante recrutamento de neutrófilos aos cérebros infectados, não observamos alteração na contagem de neutrófilos no sangue em nenhum dos tempos avaliados. A contagem de monócitos não foi alterada no sangue e nem no tecido, e juntamente com outros dados, indicam que monócitos tem uma participação mínima na infecção. A contribuição de eosinófilos é complexa e variou entre diferentes linhagens de camundongos e tempos de infecção, e requer mais estudos para interpretação. De forma importante, o recrutamento de linfócitos e neutrófilos ao CNS observados neste modelo animal reproduz o fenômeno observado na doença humana [34], indicando que aspectos da resposta imune ao SLEV podem ser estudados neste modelo em camundongos. Mais estudos são necessários para delinear as contribuições dos tipos celulares recrutados ao cérebro ao desenvolvimento da doença, especialmente as contribuições de cada linhagem de linfócito T e de células NK, que já foram associadas ao controle de flavivirus em cérebros infectados.

A análise histológica indicou que a infecção experimental por SLEV causa dano ao CNS (Fig.12, 13). Em paralelo, a análise comportamental mostrou que camundongos infectados possuem alterações comportamentais que precedem e são subsequentes ao pico da infecção (Fig.14, 15). Tais características são observadas em pacientes com encefalite de St. Louis [37], o que confirma o sucesso do modelo experimental em reproduzir vários aspectos da doença grave induzida por SLEV. De forma interessante, uma das áreas mais afetadas pela infecção foi o hipocampo, no qual observamos uma enorme perda neuronal (Fig.12), mudanças de perfil de micróglia e expressão de caspase-3 ativada (Fig.20, 21). O hipocampo é tradicionalmente associado à geração e consolidação de memória, e pacientes que sobrevivem à encefalite de St. Louis frequentemente apresentam sequelas neurológicas como perda de memória. Portanto, o acometimento do hipocampo observado na infecção experimental por SLEV é um provável mecanismo pelo qual a perda de memória acontece em pacientes convalescentes.

Outras sequelas neurológicas apresentadas por humanos (e outros vertebrados) são paralisia (Fig.2) e descoordenação motora. Como mencionado anteriormente, paralisia é uma característica apresentada por camundongos infectados que evoluem a morte, especialmente na linhagem C57BL/6. Camundongos SV129 são mais resistentes e, quando sobrevivem a infecção, alguns animais apresentam paralisia dos membros traseiros. O teste de campo aberto foi empregado para avaliar a atividade locomotora espontânea, na tentativa de observar se camundongos que sobrevivem à infecção por SLEV também desenvolvem descoordenação motora. O resultado do teste de campo aberto indicou que camundongos têm locomoção espontânea diminuída, sugerindo que SLEV pode causar descoordenação motora em camundongos. Outros estudos comportamentais são necessários para avaliar sequelas na memória e coordenação causadas por SLEV em camundongos, possivelmente empregando o labirinto aquático e o rota-rod, respectivamente.

O estudo dos papéis dos IFNs fazia parte dos esforços de padronização do modelo experimental, mas levou a resultados inesperados que culminaram no desenvolvimento da tese. O resultado referido trata dos experimentos de sobrevivência, nos quais camundongos deficientes em respostas de IFNs tipo I e tipo II apresentam fenótipos distintos na infecção experimental por SLEV (Fig.16). Enquanto a susceptibilidade aumentada de camundongos $ABR^{-/-}$ ao SLEV era esperada, em função da abundância de literatura confirmando o papel de IFNs tipo I no controle

de flavivirus, a resistência moderada de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ foi surpreendente. $IFN\gamma$ é importante para a ativação de fagócitos e coordenação da resposta de linfócitos T citotóxicos (CTLs) no contexto de infecção por WNV, na periferia. No CNS infectado, $IFN\gamma$ pode ser patogênico ao causar desequilíbrio na ação de CTLs, sendo que sua ausência é protetora em determinadas condições de infecção [154]. A população de células produtoras de $IFN\gamma$ não foi identificada nos estudos. A capacidade de linfócitos T $CD4^+$ em produzir $IFN\gamma$, e a presença destas células no cérebro concomitante ao pico de produção de $IFN\gamma$ sugere que linfócitos T $CD4^+$ pode ser a principal fonte celular de $IFN\gamma$ no modelo experimental de SLEV.

A investigação do fenótipo de susceptibilidade de camundongos $ABR^{-/-}$ apontou imediatamente para o papel crucial da replicação de SLEV na ocorrência de mortalidade (Fig.16, Fig.17). Apesar de SLEV ter sido capaz de se disseminar sistemicamente em camundongos $ABR^{-/-}$, causando a infecção e produção de citocinas no baço, o caráter agudo da mortalidade e o aparecimento de sinais de doença consistentes com encefalite foram indicativos de que a patogênese se dava principalmente no CNS. Nós hipotetizamos que o aumento da carga viral levaria ao desenvolvimento acelerado de encefalite, justificando a morte exacerbada de animais $ABR^{-/-}$. No entanto, à exceção da produção de citocinas no cérebro, que ocorreu de forma precoce em camundongos $ABR^{-/-}$, outros parâmetros de doença foram indistinguíveis entre camundongos WT e $ABR^{-/-}$ (Fig.18, 19). Considerando que o papel de leucócitos circulantes, externos ao CNS, não explicava a susceptibilidade de camundongos $ABR^{-/-}$, nós investigamos os efeitos diretos de IFNs tipo I na resposta imune inata à infecção no cérebro. A observação que camundongos $ABR^{-/-}$ tem expressão atrasada, diminuída ou abolida de ISGs fornece um mecanismo pelo qual a replicação de SLEV se torna descontrolada nos tecidos de animais $ABR^{-/-}$, rapidamente levando o camundongo à morte.

Dentre os genes avaliados, a expressão reduzida de OAS1b, OASL2 e RIG-I podem ser peças-chave na susceptibilidade aumentada de camundongos $ABR^{-/-}$ (Fig.22). OAS1b é induzido por IFNs tipo I e foi originalmente identificado como o gene da “resistência murina à flavivirus”, clonado pelo grupo da pesquisadora Margo Brinton em 2002 [155]. Inclusive, uma variação alélica no gene OAS1 (gene ortólogo a OAS1b em humanos), que resulta em menor atividade, foi identificada como fator de risco na infecção por WNV [156]. A expressão de OASL2 também apresenta propriedades antivirais contra flavivirus [157, 158]. Recentemente, um dos mecanismos identificados para a ação antiviral de OASL foi identificado, no qual OASL se liga a

RIG-I e potencializa sua ativação no contexto de infecção viral [158]. RIG-I é um PRR essencial à resposta imune inata a flavivirus, cuja expressão e atividade são cruciais à indução de IFNs do tipo I [92, 101]. A ação autócrina e parácrina de IFNs do tipo I leva à indução de ISGs, incluindo fatores de transcrição, citocinas e quimiocinas, e causa aumento na expressão de PRRs, como RIG-I. Nossos experimentos mostraram que deficiência na sinalização de IFNs do tipo I previne o aumento da expressão de RIG-I na infecção por SLEV, indicando que a expressão de RIG-I é controlada como a expressão de um ISG, corroborando dados da literatura sobre a biologia desta molécula. Ainda, a expressão diminuída de OASL2 pode agravar a responsividade de RIG-I à SLEV. Esta conjuntura de fatores caracteriza a incapacidade do hospedeiro em reconhecer o RNA de SLEV e responder à infecção, e situa RIG-I como uma molécula essencial à resposta imune inata a SLEV, nas suas capacidades de sensor de RNA e desencadeador de respostas imunes inatas e antivirais. A helicase/ PRR MDA5 pode atuar de formas similares a RIG-I em infecções por flavivirus [159], porém sua expressão não foi avaliada no contexto de infecção pelo SLEV.

A atividade antiviral dos ISGs Mx1 e Mx2 é relacionada à ligação dessas proteínas a nucleocapsídeos virais e à prevenção da importação nuclear, sendo importantes para o controle de vírus que possuem uma fase de replicação nuclear [160]. Flavivirus não se replicam no núcleo das células, e o papel de proteínas Mx ainda não foi descrito na infecção por SLEV. ISG15 é induzido em infecções por flavivirus [96, 161] e está associado à proteção do hospedeiro [162]. ISG15 atua ao se ligar covalentemente a proteínas celulares e virais, causando mudanças na atividade e meia-vida destas proteínas. Os mecanismos pelos quais ISG15 atua na resposta antiviral ainda não estão elucidados, especialmente na infecção por SLEV.

A investigação do fenótipo de resistência moderada de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ à infecção remeteu aos papéis de ISGs no controle da replicação de SLEV, uma vez que o fenótipo não pôde ser explicado por diferenças nos parâmetros de doença externos ao CNS (Fig.23, 24). Camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ infectados possuem uma menor carga viral no cérebro do que camundongos WT, ao pico da infecção. Salvo a incapacidade de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ em produzir $IFN\gamma$, os níveis de citocinas foram indistinguíveis entre os grupos infectados. Isto difere do observado em camundongos $ABR^{-/-}$, que apresentaram níveis elevados de citocinas em comparação com o respectivo grupo WT. Os dados de contagem total e diferencial também não evidenciaram diferenças entre grupos $IFN\gamma^{-/-}$ e WT infectados, como observado no recrutamento

de neutrófilos e eosinófilos ao cérebro (Fig.24). A exceção à regra foi observada na atividade de NAG no cérebro, que indicou que animais $IFN\gamma^{-/-}$ possuem uma quantidade menor de macrófagos/ micróglia do que animais WT, em condições normais. O ensaio de NAG não diferencia macrófagos e micróglia, porém fatos como a micróglia ser residente no CNS e o influxo de leucócitos ao CNS ser limitado em condições de homeostase indicam que a população envolvida é a micróglia. As implicações da mudança na atividade de NAG em cérebros $IFN\gamma^{-/-}$, e como ela se associa com o fenótipo de proteção em camundongos $IFN\gamma^{-/-}$, permanecem desconhecidas.

A expressão de ISGs no cérebro de camundongos WT (C57BL/6) e $IFN\gamma^{-/-}$ mostrou um padrão muito diferente do observado em camundongos $ABR^{-/-}$ (Fig.25). O inóculo de SLEV, tempos de coleta e linhagem de camundongos variaram dentre os experimentos, o que certamente contribuiu para perfis de expressão de ISGs tão distintos. Dentre os ISGs cuja expressão foi detectada nos cérebros, RIG-I e ISG20 são expressos de forma diferenciada entre camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ e fornecem possíveis mecanismos para a resistência aumentada de $IFN\gamma^{-/-}$. A expressão basal elevada de RIG-I em cérebros de camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ é um achado sem precedentes, que sugere novamente que RIG-I está envolvido no controle da replicação de SLEV. Propomos um mecanismo no qual os níveis basais elevados de RIG-I facilitam a detecção e resposta à infecção por SLEV no cérebro, levando a uma resposta imune inata mais efetiva e à redução da carga viral. A ação mais eficaz de RIG-I contra SLEV neste contexto poderia levar à expressão aumentada de $IFN\alpha 4$ no cérebro, porém camundongos WT e $IFN\gamma^{-/-}$ expressam níveis similares de $IFN\alpha 4$ ao sétimo dia p.i. No entanto, é provável que outros IFNs do tipo I estejam envolvidos, e que o sétimo dia seja um momento tardio para a observação do mecanismo proposto. Em contraste, a expressão aumentada de RIG-I em camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ não parece ser dependente de $IFN\alpha 4$, pois camundongos $IFN\gamma^{-/-}$ Mock apresentam níveis normais da citocina. Novos experimentos são necessários para a investigação do papel protetor de RIG-I na infecção por SLEV, por exemplo, envolvendo o estímulo ou bloqueio/ silenciamento de RIG-I em culturas celulares *in vitro*, e a observação de alterações na replicação de SLEV. Ainda, estudos são necessários para determinar o mecanismo pelo qual a ausência de $IFN\gamma$ resulta em expressão aumentada de RIG-I no cérebro.

A expressão de ISG20 se mostrou aumentada somente no cérebro de camundongos WT infectados com SLEV, permanecendo não alterada em camundongos IFN γ ^{-/-} infectados (Fig.25). Este resultado também difere do observado em experimentos com camundongos ABR^{-/-}, nos quais sua expressão foi moderada em comparação com os demais ISGs, e acompanhou o perfil de produção de IFN α 4 (Fig.22). ISG20 é uma RNase com alta especificidade para RNA fita simples [163], capaz de restringir a replicação de YFV, WNV e DENV *in vitro* [164, 165]. A associação de uma menor carga viral à expressão inalterada de ISG20 no cérebro de camundongos IFN γ ^{-/-} sugere que ISG20 não está envolvido no controle de SLEV *in vivo*. Ainda, IFN γ pode estar associado ao controle da expressão de ISG20 no cérebro, uma vez que a infecção pelo SLEV não causa aumento da expressão deste ISG em camundongos IFN γ ^{-/-}.

Em relação aos IFNs do tipo III, observamos que a produção de IFN λ ocorre nos cérebros de camundongos somente na condição de deficiência em IFN γ (Fig.26). IFN λ é produzido em e tem ação em superfícies mucosas e epiteliais. O único relato na literatura a respeito da participação de IFN λ na infecção por um flavivirus (WNV) *in vivo* [138] utiliza camundongos deficientes em IFNLR e/ou recorre a tratamentos com IFN λ 3 exógeno, sendo que não há dados que mostrem a produção de IFN λ pelo hospedeiro, no CNS. Neste contexto, a de expressão de IFN λ 2/3 nos cérebros de camundongos IFN γ ^{-/-} infectados é um achado pioneiro. O significado biológico da produção de IFN λ no cérebro é de difícil interpretação, pois neurônios expressam baixíssimos níveis de IFNLR [138] e a expressão em outros tipos celulares no CNS é desconhecida. Apesar disso, a expressão condicional de IFN λ no cérebro de camundongos infectados aponta para outro mecanismo desconhecido pelo qual IFN γ regula a expressão e função de outros tipos de IFN.

Acreditamos que o modelo estabelecido com esta tese contribui de forma significativa ao estudo da encefalite de St. Louis. Pouquíssimas pesquisas sobre SLEV foram publicadas nas últimas décadas. A última pesquisa publicada que incluí estudos de infecção *in vivo* é datada de quase 15 anos atrás. Pesquisas sobre a doença e tentativas de modelagem datam da metade do século passado. A emergência de dengue, *west nile*, zika e a ameaça constante representada na febre amarela, combinados à diminuição da incidência da encefalite de St. Louis, certamente contribuiu para o declínio da pesquisa sobre SLEV. Muitos dos dados apresentados nesta tese,

sobre a complexa interação de SLEV com o hospedeiro vertebrado, foram gerados pela primeira vez na história.

Além da relevância específica de nossos estudos sobre a biologia de SLEV, nosso modelo complementa a literatura sobre encefalites causadas por flavivirus. Nossos dados confirmaram o papel essencial da resposta de IFNs do tipo I para o controle da replicação e patogênese causada por flavivirus. Ainda, o delineamento das funções e interações entre IFNs no modelo de infecção pelo SLEV traz novas informações e identificação de mecanismos antes desconhecidos, que são significativos à pesquisa sobre a doença causada por flavivirus e para o campo da neuroimunologia. Um exemplo disso é o impacto dos nossos achados sobre a utilização de camundongos AG129, que não expressam receptores de IFNs do tipo I e II. Camundongos AG129 têm sido amplamente utilizados para modelagem de doenças causadas por flavivirus, sob a premissa que a ausência da atividade de IFNs do tipo II é necessariamente prejudicial ao hospedeiro. A predominância da resposta de IFNs do tipo I no controle viral na resposta imune inata dificulta a apreciação do papel de IFN γ . Nossos dados indicam o fenótipo de deficiência em IFNs do tipo II é dependente do compartimento onde a doença se desenvolve (CNS, periferia) e, portanto, deve ser considerado com cautela.

Outros exemplos da aplicabilidade do modelo de SLEV envolvem a encefalite japonesa, que constitui um sério problema de saúde na Índia e no restante do sudeste asiático. A encefalite japonesa compartilha um alto grau de similaridade com a encefalite de St. Louis, sendo que o conhecimento gerado com o estudo de SLEV pode ter aplicações diretas no estudo das infecções por JEV, auxiliando no desenvolvimento de tratamentos e no aprimoramento das vacinas já existentes. Ainda, a demanda recente por conhecimento sobre Zika se beneficia pela existência de modelos experimentais bem caracterizados, e da infraestrutura e *know-how* que os acompanham. Flavivírus que causam encefalite foram amplamente utilizados como microrganismos-modelo para a caracterização de respostas antivirais e de patogênese *in vivo* e *in vitro*, fornecendo informações e mecanismos propostos que auxiliam no rápido desenvolvimento de um novo campo de pesquisa, tal como o estudo da associação entre ZIKV e microcefalia em recém-nascidos.

Por fim, o processo de desenvolvimento desta tese trouxe questionamentos sobre o funcionamento do sistema imune e sua real contribuição ao hospedeiro vertebrado, dispostos em

detalhes no **Anexo 1**. Inúmeros relatos na literatura implicam o sistema imune em atividades fisiológicas que indicam que o sistema imune está envolvido em muito mais do que a defesa do hospedeiro contra infecções. Um pensamento crítico das atribuições do sistema imune, desvinculado da associação tradicional às infecções, nos mostrou que as capacidades sensoriais do sistema imune são extraordinárias, permitindo o reconhecimento e interpretação de uma infinidade de estímulos químicos, físicos e biológicos, e a manutenção de interações extremamente complexas entre o hospedeiro e outros organismos. Essas e outras atribuições colocam o sistema imune em associação íntima com o sistema nervoso, com o qual compartilha similaridades como propriedades sensoriais, habilidade no manejo, interpretação e conservação de informação, e capacidade em definir uma identidade própria ao hospedeiro. Essas inferências sugerem que os sistemas nervoso e imune podem ter estar conectados e relacionados de maneiras nunca antes pensadas. Uma nova maneira de interpretar o funcionamento do sistema imune pode trazer benefícios ao desenvolvimento da imunologia como ciência em si, e ao estudo de doenças, especialmente aquelas onde o envolvimento dos sistemas imune e nervoso são concomitantes e intensos, como nas encefalites virais.

6. Conclusões e perspectivas

Com base nas informações contidas nessa tese, e nos objetivos propostos, concluímos que o modelo da encefalite de St. Louis em camundongos foi estabelecido com sucesso. A geração de dados de referência sobre a linhagem SLEV BeH 355964 e a padronização de técnicas virológicas para o estudo da mesma permitiu o desenvolvimento de um modelo animal confiável e bem caracterizado. Este modelo permite o estudo da forma grave de doença causada pelo SLEV, a encefalite, de forma robusta e prática. O modelo reproduz vários aspectos clínicos da doença humana em camundongos, tais como mortalidade, replicação viral, dano ao CNS e alterações comportamentais, o que caracteriza o modelo como plataforma válida para o estudo da encefalite de St. Louis.

A padronização deste modelo experimental permitiu a observação de aspectos pouco estudados da doença, como a inflamação associada à infecção. A infecção em camundongos possui um componente inflamatório agudo, que inclui a produção de citocinas, a ativação de células residentes e recrutamento de diferentes populações de leucócitos. O estudo mais aprofundado de tais mecanismos determinará se a inflamação no CNS é benéfica ou prejudicial ao hospedeiro no contexto de infecção pelo SLEV.

Como proposto, caracterizamos a replicação e disseminação de SLEV em órgãos chave em infecções por flavivirus, o cérebro e o baço. SLEV é apto à replicação nos cérebros de camundongos imunocompetentes adultos, e a replicação de SLEV está diretamente relacionada à capacidade do vírus em causar doença e mortalidade neste modelo animal. Esta conclusão tem implicações no desenvolvimento de tratamentos, pois embasa o uso de antivirais como estratégia terapêutica em infecções neurotrópicas por flavivirus.

Em termos de mecanismos de doença e resistência, esta tese descreve o papel crucial de IFNs do tipo I e ISGs em controlar a infecção por SLEV no cérebro, portanto constituindo um importante mecanismo de resistência à infecção. Dentre as moléculas estudadas, RIG-I parece desempenhar um papel fundamental na resposta imune ao SLEV, e está relacionado a ambos os fenótipos associados às deficiências em IFNs tipo I e II. O estudo do papel de IFN γ indicou que esta molécula está envolvida na modulação de RIG-I e de IFN λ no contexto de infecção pelo

SLEV, indicando que existem mecanismos desconhecidos de ação de IFNs que merecem ser investigados, e que podem proporcionar novas estratégias terapêuticas.

Além da geração de conhecimento técnico acerca da encefalite de St. Louis, possivelmente aplicável a viroses relacionadas, o desenvolvimento desta tese resultou na formação de cientistas especialistas em flavivirus, algo desejável uma época onde flavivirus emergentes, como Zika e Dengue, representam um grave problema de saúde brasileiro e mundial.

7. Bibliografia

1. Luby, J.P., S.E. Sulkin, and J.P. Sanford, *The epidemiology of St. Louis encephalitis: a review*. Annu Rev Med, 1969. **20**: p. 329-50.
2. Kopp, A., et al., *Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus*. MBio, 2013. **4**(3): p. e00322-13.
3. Rocco, I.M., et al., *St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2005. **47**(5): p. 281-5.
4. Causey, O.R., R.E. Shope, and M. Theiler, *Isolation of St. Louis Encephalitis Virus from Arthropods in Par'a, Brazil*. Am J Trop Med Hyg, 1964. **13**: p. 449.
5. de Souza Lopes, O., et al., *Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil*. Am J Trop Med Hyg, 1979. **28**(3): p. 583-5.
6. Gould, E.A. and T. Solomon, *Pathogenic flaviviruses*. Lancet, 2008. **371**(9611): p. 500-9.
7. Baillie, G.J., et al., *Phylogenetic and evolutionary analyses of St. Louis encephalitis virus genomes*. Mol Phylogenet Evol, 2008. **47**(2): p. 717-28.
8. Lindenbach, B., Rice, C., *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe, D., Howley, P., Fields Virology, 2001. **Lippincott-Raven P, Philadelphia.**: p. 991-1041.
9. Tesh, R.B., et al., *Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(3): p. 245-51.
10. Gubler, D., Kuno, G., Markoff, L., *Flaviviruses*. In: Knipe, D., Howley, P., Fields Virology, 2007(Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia): p. 1154-1251.
11. Vedovello, D., et al., *First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil*. Arch Virol, 2015. **160**(5): p. 1189-95.
12. Rosa, R., et al., *Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(11): p. e2537.
13. Hammon, W.M., et al., *Isolation of the Viruses of Western Equine and St. Louis Encephalitis from Culex Tarsalis Mosquitoes*. Science, 1941. **94**(2440): p. 328-30.
14. Mitchell, C.J., T.P. Monath, and M.S. Sabattini, *Transmission of St. Louis encephalitis virus from Argentina by mosquitoes of the Culex pipiens (Diptera: Culicidae) complex*. J Med Entomol, 1980. **17**(3): p. 282-5.
15. Bowen, G.S., et al., *Geographic variation among St. Louis encephalitis virus strains in the viremic responses of avian hosts*. Am J Trop Med Hyg, 1980. **29**(6): p. 1411-9.
16. Weaver, S.C. and A.D. Barrett, *Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 789-801.
17. Ludlam, C.A., et al., *Clinical perspectives of emerging pathogens in bleeding disorders*. Lancet, 2006. **367**(9506): p. 252-61.
18. Bredeck, J.F., *The Story of the Epidemic of Encephalitis in St. Louis*. Am J Public Health Nations Health, 1933. **23**(11): p. 1135-40.
19. Neal, J.B., *Types of Epidemic Encephalitis : A Comparison of the Cases Seen in St. Louis in 1933 With Those Seen in New York City*. Am J Public Health Nations Health, 1933. **23**(11): p. 1144-8.
20. Webster, L.T. and G.L. Fite, *A Virus Encountered in the Study of Material from Cases of Encephalitis N the St. Louis and Kansas City Epidemics of 1933*. Science, 1933. **78**(2029): p. 463-5.
21. Webster, L.T. and G.L. Fite, *St. Louis Encephalitis*. Science, 1934. **79**(2046): p. 254-5.
22. Casals, J., *Immunological Relationships among Central Nervous System Viruses*. J Exp Med, 1944. **79**(4): p. 341-59.
23. Terzian, A.C., et al., *Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(3): p. 291-300.
24. Mondini, A., et al., *Saint Louis encephalitis virus, Brazil*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(1): p. 176-8.

25. Mondini, A., et al., *Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil*. J Clin Virol, 2007. **40**(1): p. 84-6.
26. Cardoso, C.W., et al., *Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(12): p. 2274-6.
27. Vogel, G., *EMERGING DISEASES. A race to explain Brazil's spike in birth defects*. Science, 2016. **351**(6269): p. 110-1.
28. Valinotto, L.E., et al., *Molecular evidence of St. Louis encephalitis virus infection in patients in Buenos Aires, Argentina*. J Clin Virol, 2012.
29. Diaz, L.A., et al., *Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005)*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(1): p. e1489.
30. Spinsanti, L.I., et al., *Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005*. J Clin Virol, 2008. **42**(1): p. 27-33.
31. Monath, T.P., *Epidemiology*. Monath, T.P., ed. *St. Louis Encephalitis 1980*, Washington, DC: American Public Health Association.
32. Hollidge, B.S., F. Gonzalez-Scarano, and S.S. Soldan, *Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(3): p. 428-42.
33. Fauci, A.S. and D.M. Morens, *Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat*. N Engl J Med, 2016.
34. Muckenfuss, R.S., *Clinical Observations and Laboratory Investigations on the 1933 Epidemic of Encephalitis in St. Louis*. Bull N Y Acad Med, 1934. **10**(7): p. 444-53.
35. Clark, D.C., A.C. Brault, and E. Hunsperger, *The contribution of rodent models to the pathological assessment of flaviviral infections of the central nervous system*. Arch Virol, 2012.
36. Monath, T.P., et al., *Variation in virulence for mice and rhesus monkeys among St. Louis encephalitis virus strains of different origin*. Am J Trop Med Hyg, 1980. **29**(5): p. 948-62.
37. Southern, P.M., Jr., et al., *Clinical and laboratory features of epidemic St. Louis encephalitis*. Ann Intern Med, 1969. **71**(4): p. 681-9.
38. Ye, C., et al., *Silencing early viral replication in macrophages and dendritic cells effectively suppresses flavivirus encephalitis*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17889.
39. Reisen, W.K., *Epidemiology of St. Louis encephalitis virus*. Adv Virus Res, 2003. **61**: p. 139-83.
40. Calisher, C.H., *Medically important arboviruses of the United States and Canada*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(1): p. 89-116.
41. Greve, K.W., et al., *The neurobehavioural consequences of St. Louis encephalitis infection*. Brain Inj, 2002. **16**(10): p. 917-27.
42. Leyssen, P., E. De Clercq, and J. Neyts, *Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(1): p. 67-82, table of contents.
43. Pugachev, K.V., et al., *Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool*. Am J Trop Med Hyg, 2004. **71**(5): p. 639-45.
44. Barrett, A.D., *Current status of flavivirus vaccines*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **951**: p. 262-71.
45. Turtle, L., M.J. Griffiths, and T. Solomon, *Encephalitis caused by flaviviruses*. QJM, 2012. **105**(3): p. 219-23.
46. King, L.S., *Experimental Encephalitis : Some Factors Affecting Infection with Certain Neurotropic Viruses*. J Exp Med, 1940. **72**(5): p. 573-93.
47. Maximova, O.A., et al., *Cellular inflammatory response to flaviviruses in the central nervous system of a primate host*. J Histochem Cytochem, 2009. **57**(10): p. 973-89.
48. Chu, C.T., et al., *Electron microscopic diagnosis of human flavivirus encephalitis: use of confocal microscopy as an aid*. Am J Surg Pathol, 1999. **23**(10): p. 1217-26.
49. Blattner, R.J. and F.M. Heys, *Isolation of St. Louis encephalitis virus from the peripheral blood of a human subject*. J Pediatr, 1946. **28**: p. 401-6.

50. Wasay, M., et al., *St Louis encephalitis: a review of 11 cases in a 1995 Dallas, Tex, epidemic*. Arch Neurol, 2000. **57**(1): p. 114-8.
51. Brinker, K.R., Monath, T.P., *The acute disease*. In: Monath T.P. (ed) *St Louis encephalitis*.1980, Washington, DC: American Public Health Association.
52. Reyes, M.G., et al., *St Louis encephalitis. Quantitative histologic and immunofluorescent studies*. Arch Neurol, 1981. **38**(6): p. 329-34.
53. Cerna, F., et al., *St. Louis encephalitis and the substantia nigra: MR imaging evaluation*. AJNR Am J Neuroradiol, 1999. **20**(7): p. 1281-3.
54. Furr, S.R. and I. Marriott, *Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 201.
55. Slavín, H.B., *Persistence of the Virus of St. Louis Encephalitis in the Central Nervous System of Mice for Over Five Months*. J Bacteriol, 1943. **46**(2): p. 113-6.
56. Andersen, A.A. and R.P. Hanson, *Influence of sex and age on natural resistance to St. Louis encephalitis virus infection in mice*. Infect Immun, 1974. **9**(6): p. 1123-5.
57. Spinsanti, L.I., et al., *Age-related seroprevalence study for St. Louis encephalitis in a population from Cordoba, Argentina*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2002. **44**(2): p. 59-62.
58. Nayar, J.K., L. Rosen, and J.W. Knight, *Experimental vertical transmission of Saint Louis encephalitis virus by Florida mosquitoes*. Am J Trop Med Hyg, 1986. **35**(6): p. 1296-301.
59. Mitchell, C.J., D.J. Gubler, and T.P. Monath, *Variation in infectivity of Saint Louis encephalitis viral strains for Culex pipiens quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)*. J Med Entomol, 1983. **20**(5): p. 526-33.
60. Rubio, A., et al., *Imperviousness as a predictor for infestation levels of container-breeding mosquitoes in a focus of dengue and Saint Louis encephalitis in Argentina*. Acta Trop, 2013. **128**(3): p. 680-5.
61. Diaz, L.A., et al., *Comparison of argentinean saint louis encephalitis virus non-epidemic and epidemic strain infections in an avian model*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(5): p. e1177.
62. McLean, R.G., D.B. Francý, and E.G. Campos, *Experimental studies of St. Louis encephalitis virus in vertebrates*. J Wildl Dis, 1985. **21**(2): p. 85-93.
63. Xiao, S.Y., et al., *Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with heterologous flaviviruses*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **68**(6): p. 695-703.
64. Siirin, M.T., et al., *Chronic St. Louis encephalitis virus infection in the golden hamster (Mesocricetus auratus)*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **76**(2): p. 299-306.
65. Monath, T.P., C.B. Cropp, and A.K. Harrison, *Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy*. Lab Invest, 1983. **48**(4): p. 399-410.
66. Hammon, W.M., W.C. Reeves, and E.M. Izumi, *St. Louis Encephalitis Virus in the Blood of Experimentally Inoculated Fowls and Mammals*. J Exp Med, 1946. **83**(3): p. 175-83.
67. Rivarola, M.E., et al., *Virulence variation among epidemic and non-epidemic strains of Saint Louis encephalitis virus circulating in Argentina*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014. **109**(2): p. 197-201.
68. Phillipotts, R.J., et al., *Antibody and interleukin-12 treatment in murine models of encephalitogenic flavivirus (St. Louis encephalitis, tick-borne encephalitis) and alphavirus (Venezuelan equine encephalitis) infection*. J Interferon Cytokine Res, 2003. **23**(1): p. 47-50.
69. Brooks, T.J. and R.J. Phillipotts, *Interferon-alpha protects mice against lethal infection with St Louis encephalitis virus delivered by the aerosol and subcutaneous routes*. Antiviral Res, 1999. **41**(1): p. 57-64.
70. O'Leary, J.L., M.G. Smith, and H.R. Reames, *Influence of Age on Susceptibility of Mice to St. Louis Encephalitis Virus and on the Distribution of Lesions*. J Exp Med, 1942. **75**(2): p. 233-46.

71. Peck, J.L. and A.B. Sabin, *Multiplication and Spread of the Virus of St. Louis Encephalitis in Mice with Special Emphasis on Its Fate in the Alimentary Tract*. J Exp Med, 1947. **85**(6): p. 647-62.
72. Smadel, J.E. and E. Moore, *Changes Produced in the Central Nervous System of the Mouse by the Virus of St. Louis Encephalitis*. Am J Pathol, 1934. **10**(6): p. 827-834 3.
73. Licon Luna, R.M., et al., *Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice*. J Virol, 2002. **76**(7): p. 3202-11.
74. Chavez, J.H., et al., *Influence of the CCR-5/MIP-1 alpha axis in the pathogenesis of Rocio virus encephalitis in a mouse model*. Am J Trop Med Hyg, 2013. **89**(5): p. 1013-8.
75. Lai, H., et al., *Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(6): p. 2419-24.
76. Lanteri, M.C., et al., *Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3266-77.
77. Rouse, B.T. and S. Sehrawat, *Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 514-26.
78. Marques, R.E., et al., *Dengue*. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function, 2014. **6**(1): p. 1-104.
79. Limon-Flores, A.Y., et al., *Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells*. Int J Exp Pathol, 2005. **86**(5): p. 323-34.
80. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 564-81.
81. Bardina, S.V. and J.K. Lim, *The role of chemokines in the pathogenesis of neurotropic flaviviruses*. Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 121-32.
82. Cho, H. and M.S. Diamond, *Immune responses to West Nile virus infection in the central nervous system*. Viruses, 2012. **4**(12): p. 3812-30.
83. Han, Y.W., et al., *Distinct dictation of Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality via triggering TLR3 and TLR4 signal pathways*. PLoS Pathog, 2014. **10**(9): p. e1004319.
84. Nazmi, A., et al., *TLR7 is a key regulator of innate immunity against Japanese encephalitis virus infection*. Neurobiol Dis, 2014. **69**: p. 235-47.
85. Daffis, S., et al., *Measure and countermeasure: type I IFN (IFN-alpha/beta) antiviral response against West Nile virus*. J Innate Immun, 2009. **1**(5): p. 435-45.
86. Weber, F., *The catcher in the RIG-I*. Cytokine, 2015. **76**(1): p. 38-41.
87. Sun, Y.W., *RIG-I, a Human Homolog Gene of RNA Helicase, Is Induced by Retinoic Acid During the Differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cell*, 1997, Shanghai Second Medical University.
88. Zhang, X., et al., *An RNA helicase, RHIV -1, induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is mapped on porcine chromosome 10q13*. Microb Pathog, 2000. **28**(5): p. 267-78.
89. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
90. Nazmi, A., et al., *Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections*. Virus Res, 2014. **185**: p. 32-40.
91. Fredericksen, B.L. and M. Gale, Jr., *West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2913-23.
92. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.

93. Nazmi, A., K. Dutta, and A. Basu, *RIG-I mediates innate immune response in mouse neurons following Japanese encephalitis virus infection*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21761.
94. Miorin, L., et al., *Formation of membrane-defined compartments by tick-borne encephalitis virus contributes to the early delay in interferon signaling*. Virus Res, 2012. **163**(2): p. 660-6.
95. Nasirudeen, A.M., et al., *RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(1): p. e926.
96. Hamel, R., et al., *Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells*. J Virol, 2015. **89**(17): p. 8880-96.
97. Suthar, M.S., M.S. Diamond, and M. Gale, Jr., *West Nile virus infection and immunity*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(2): p. 115-28.
98. Brinton, M.A., *Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus*. Viruses, 2014. **6**(1): p. 13-53.
99. Quicke, K.M. and M.S. Suthar, *The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection*. Viruses, 2013. **5**(11): p. 2643-58.
100. Querec, T., et al., *Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity*. J Exp Med, 2006. **203**(2): p. 413-24.
101. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
102. Glass, W.G., et al., *Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1087-98.
103. Netland, J. and M.J. Bevan, *CD8 and CD4 T cells in west nile virus immunity and pathogenesis*. Viruses, 2013. **5**(10): p. 2573-84.
104. Tyler, K.L., *Current developments in understanding of West Nile virus central nervous system disease*. Curr Opin Neurol, 2014. **27**(3): p. 342-8.
105. Kasturi, S.P., et al., *Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity*. Nature, 2011. **470**(7335): p. 543-7.
106. Pulendran, B., et al., *Immunity to viruses: learning from successful human vaccines*. Immunol Rev, 2013. **255**(1): p. 243-55.
107. Appaiahgari, M.B. and S. Vрати, *IMOJEV((R)): a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine*. Expert Rev Vaccines, 2010. **9**(12): p. 1371-84.
108. Monath, T.P. and P.F. Vasconcelos, *Yellow fever*. J Clin Virol, 2015. **64**: p. 160-73.
109. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
110. Borden, E.C., et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 975-90.
111. O'Brien, C.A., et al., *Viral RNA intermediates as targets for detection and discovery of novel and emerging mosquito-borne viruses*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(3): p. e0003629.
112. Uchida, L., et al., *The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7395.
113. Meylan, E. and J. Tschopp, *Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses*. Mol Cell, 2006. **22**(5): p. 561-9.
114. Tenover, B.R., et al., *Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity*. Science, 2007. **315**(5816): p. 1274-8.
115. Hardy, M.P., et al., *Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes*. Genomics, 2004. **84**(2): p. 331-45.
116. van Boxel-Dezaire, A.H., M.R. Rani, and G.R. Stark, *Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 361-72.

117. van Boxel-Dezaire, A.H. and G.R. Stark, *Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. **316**: p. 119-54.
118. Der, S.D., et al., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15623-8.
119. Biron, C.A.S., G. C., *Fields Virology*, ed. D.M. Knipe 2006, Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins
120. Silverman, R.H., *Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response*. *J Virol*, 2007. **81**(23): p. 12720-9.
121. Thakur, C.S., et al., *Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(23): p. 9585-90.
122. Malathi, K., et al., *Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity*. *Nature*, 2007. **448**(7155): p. 816-9.
123. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(6): p. 912-20.
124. Samuel, M.A. and M.S. Diamond, *Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival*. *J Virol*, 2005. **79**(21): p. 13350-61.
125. Rahal, J.J., et al., *Effect of interferon-alpha2b therapy on St. Louis viral meningoencephalitis: clinical and laboratory results of a pilot study*. *J Infect Dis*, 2004. **190**(6): p. 1084-7.
126. Lobigs, M., et al., *Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 3): p. 567-72.
127. Hermant, P. and T. Michiels, *Interferon-lambda in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications*. *J Innate Immun*, 2014. **6**(5): p. 563-74.
128. Qing, Y. and G.R. Stark, *Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(40): p. 41679-85.
129. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-89.
130. Ransohoff, R.M., *Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology*. *Immunity*, 2009. **31**(5): p. 711-21.
131. Rothman, A.L., *Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(8): p. 532-43.
132. Fagundes, C.T., et al., *IFN-gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011. **5**(12): p. e1449.
133. Neves, P.C., et al., *Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e81953.
134. Larena, M., M. Regner, and M. Lobigs, *Cytolytic effector pathways and IFN-gamma help protect against Japanese encephalitis*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(7): p. 1789-98.
135. Best, S.M., et al., *Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist*. *J Virol*, 2005. **79**(20): p. 12828-39.
136. Shrestha, B., et al., *Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection*. *J Virol*, 2006. **80**(11): p. 5338-48.
137. Donnelly, R.P. and S.V. Kotenko, *Interferon-lambda: a new addition to an old family*. *J Interferon Cytokine Res*, 2010. **30**(8): p. 555-64.
138. Lazear, H.M., et al., *Interferon-lambda restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(284): p. 284ra59.
139. Pinheiro, F.P., et al., *Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil*. *Am J Trop Med Hyg*, 1981. **30**(1): p. 145-8.

140. de Morais Bronzoni, R.V., et al., *Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(2): p. 696-702.
141. Morais, A., et al., *The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication*. Virol J, 2013. **10**: p. 205.
142. Figueiredo, L.T., et al., *Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **59**(3): p. 357-62.
143. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, S.d.C., Tecnologia e Insumos Estratégicos, *Classificação de Risco dos Agentes Biológicos*, in A. Normas e Manuais Técnicos, E. MS, Editor 2010, Ministério da Saúde: Brasília, Brasil. p. 44.
144. Departamento de Vigilância Epidemiológica, S.d.V.e.S., *Biossegurança em laboratórios Biomédicos e de Microbiologia*. 3rd ed. A. Normas e Manuais Técnicos, ed. M.C. Althoff2006, Brasília, Brasil: Ministério da Saúde. 290.
145. Rogers, D.C., et al., *Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment*. Mamm Genome, 1997. **8**(10): p. 711-3.
146. Lackner, P., et al., *Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(2): p. 177-88.
147. Batista, W.C., et al., *Phylogenetic analysis of Brazilian Flavivirus using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3' non-coding regions*. Virus Res, 2001. **75**(1): p. 35-42.
148. Heinen, L.B., et al., *Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2015. **57**(3): p. 215-20.
149. Albarnaz, J.D., et al., *MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: implication as an antiviral therapeutic target*. Antiviral Res, 2014. **111**: p. 82-92.
150. Marques, R.E., et al., *Dengue virus requires the CC-chemokine receptor CCR5 for replication and infection development*. Immunology, 2015. **145**(4): p. 583-96.
151. Renneson, J., et al., *A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection*. Am J Pathol, 2011. **179**(4): p. 1872-83.
152. Guabiraba, R., et al., *IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection*. Eur J Immunol, 2013. **43**(6): p. 1529-44.
153. Guabiraba, R., et al., *Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15680.
154. King, N.J., et al., *Immunopathology of flavivirus infections*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(1): p. 33-42.
155. Perelygin, A.A., et al., *Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(14): p. 9322-7.
156. Lim, J.K., et al., *Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000321.
157. Yakub, I., et al., *Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection*. J Infect Dis, 2005. **192**(10): p. 1741-8.
158. Zhu, J., et al., *Antiviral activity of human OASL protein is mediated by enhancing signaling of the RIG-I RNA sensor*. Immunity, 2014. **40**(6): p. 936-48.
159. Errett, J.S., et al., *The essential, nonredundant roles of RIG-I and MDA5 in detecting and controlling West Nile virus infection*. J Virol, 2013. **87**(21): p. 11416-25.
160. Haller, O., et al., *Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity*. Trends Microbiol, 2015. **23**(3): p. 154-63.

161. Cacciotti, G., et al., *Variation in interferon sensitivity and induction between Usutu and West Nile (lineages 1 and 2) viruses*. *Virology*, 2015. **485**: p. 189-98.
162. Hishiki, T., et al., *Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **448**(1): p. 95-100.
163. Espert, L., et al., *ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 16151-8.
164. Jiang, D., et al., *Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections*. *J Virol*, 2010. **84**(16): p. 8332-41.
165. Zhou, Z., et al., *Antiviral activities of ISG20 in positive-strand RNA virus infections*. *Virology*, 2011. **409**(2): p. 175-88.

8. Anexos

8.1. Anexo 1



1 Exploring the homeostatic and sensory roles of the immune system

2 ¹Rafael Elias Marques*, ¹Pedro Elias Marques, ²Rodrigo Guabiraba, ¹Mauro Martins
3 Teixeira

4 ¹Immunopharmacology, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e
5 Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
6 ²INRA, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, 37380, Nouzilly, France

7 Number of words: 2618

8 Number of figures: 3

9 Abstract

10 Immunology developed under the notion the immune system exists to fight pathogens. Recently,
11 the discovery of interactions with commensal microbiota that are essential to human health
12 initiated a change in this old paradigm. Here, we argue the immune system has major
13 physiological roles extending far beyond defending the host. Immune and inflammatory
14 responses share the core property of sensing, defining the immune system also as a sensory
15 system. The inference the immune system collects, interprets and store information, while
16 creating an identity of self, places it in close relationship to the nervous system, which suggests
17 these systems may have a profound evolutionary connection.

18 1. Bridging Inflammation, Immunology and Physiology

19 Immunology comprises the study of the immune system and its functional properties, including
20 innate and adaptive responses, immunological memory and the relationship between the immune
21 system and disease. The current dogma states that an immune response is induced by recognition
22 of molecular patterns that trigger a quick response from the innate compartment, which in turn
23 prompts the development of adaptive immunity. This mechanism has been extensively studied in
24 the context of infection and injury, from which current understanding of the immune system has
25 been inferred (1). Recent discoveries demonstrating a role of the immune system in physiological
26 contexts, including interaction with bacterial microbiota (2), in pregnancy (3), metabolism (4),
27 organ function (5), bone homeostasis (6), exercise (7) and in senescence (8) suggest that
28 functions of the immune system extend far beyond defending the host (9). In addition, diseases
29 that are not necessarily caused by pathogens. Indeed, autoimmunity (10), cancer (11),
30 degenerative diseases (12) and psychiatric diseases (13) exemplify paradoxes and loopholes in
31 the current understanding of the immune system, indicating its theoretical basis should be
32 updated. There is a consensus among scientists that the ability of microorganisms or microbial
33 products to trigger inflammation and immune responses are important for immune function. This
34 is not being questioned here. We would like to suggest that immune functions extend far beyond
35 interaction with pathogens.

36 Inflammation is a beneficial tissue response stimulated by tissue damage, which can be caused
37 by physical, chemical or biological stimuli (14). Inflammation is defined by the production of
38 soluble mediators, in alteration of the vasculature and in the recruitment of leukocytes, ultimately
39 leading to the classical signs such as heat, swelling, redness, pain and loss of function (15).

8.2. Anexo 2

Arch Virol (2015) 160:1189–1195
DOI 10.1007/s00705-015-2378-2

ORIGINAL ARTICLE

First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil

Daniela Vedovello · Betânia Palva Drumond · Rafael Elias Marques · Lella Sabrina Ullmann · Eliane Aparecida Fávoro · Ana Carolina Bernardes Terzian · Luiz Tadeu Moraes Figueiredo · Mauro Martins Teixeira · João Pessoa Araújo Junior · Maurício Lacerda Nogueira

Received: 11 August 2014 / Accepted: 20 February 2015 / Published online: 5 March 2015
© Springer-Verlag Wien 2015

Abstract St. Louis encephalitis virus (SLEV), a member of the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, is a causative agent of encephalitis in the Americas. In Brazil, sporadic cases of SLEV infection have been reported since 1953, but the first outbreak of SLEV in Brazil was identified only in 2007, concomitant with an outbreak of dengue virus (DENV) serotype 3. This finding, along with other reports, indicates that SLEV circulation in Brazil is largely unknown, and there may be epidemiological implications of the co-circulation of SLEV, DENV and other flaviviruses in Brazil. Here, we describe the first complete genome sequence of an SLEV strain isolated from a human patient in Brazil, strain BeH 355964. Phylogenetic analysis was performed to determine the genotype of BeH 355964 using

the full-length genome and envelope (E) gene sequences separately. Both analyses showed that BeH 355964 could be classified as genotype V. Although the number of single gene sequences available is greater (such as for the E gene), the phylogenetic tree based on the complete genome sequence was better supported and provided further information about the virus.

Introduction

St. Louis encephalitis virus (SLEV) is a member of the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* [1], which also includes important human pathogens such as dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV) and yellow fever virus (YFV). Infection with SLEV may cause encephalitis, which is a life-threatening condition, with lethality rates up to 30 % and possible neurological sequelae in survivors [2]. Other flaviviruses may also cause encephalitis, exemplified by WNV, Rocio virus (ROCV) and Japanese encephalitis virus (JEV), which are grouped in the JEV serocomplex within the genus *Flavivirus* [3, 4]. SLEV and other flaviviruses are positive-stranded RNA viruses, whose genomes are about 11 kilobases (kb) in length. The SLEV life cycle is maintained by virus transmission between *Culex* ssp. mosquitoes and birds, but monkeys, sloths, armadillos and marsupials could also be reservoirs [5]. SLEV was recently isolated from the brain of a horse diagnosed with severe neurological disease in the countryside of Minas Gerais State [2], indicating that equines can develop disease after infection, like humans. It is important to note that although they become infected, humans and horses are considered dead-end hosts because they do not develop sufficient viremia for further transmission [6].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-015-2378-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Vedovello · E. A. Fávoro · A. C. B. Terzian · M. L. Nogueira (✉)
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP),
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Bloco U6-Vila São Pedro,
CEP: 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil
e-mail: mnogueira@famerp.br

B. P. Drumond
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora,
Minas Gerais, Brazil

R. E. Marques · M. M. Teixeira
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil

L. S. Ullmann · J. P. A. Junior
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

L. T. M. Figueiredo
Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

 Springer

8.3. Anexo 3

Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil

Roberta Rosa¹, Erica Azevedo Costa¹, Rafael Elias Marques², Taismara Simas Oliveira^{1,3}, Ronaldo Furtini³, Maria Rosa Quaresma Bomfim⁴, Mauro Martins Teixeira², Tatiane Alves Paixão⁵, Renato Lima Santos^{1*}

1 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Laboratório de Saúde Animal, Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Biologia Parasitária, Centro Universitário do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil, **5** Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract

St. Louis encephalitis virus (SLEV) is a causative agent of encephalitis in humans in the Western hemisphere. SLEV is a positive-sense RNA virus that belongs to the *Flavivirus* genus, which includes West Nile encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, Dengue virus and other medically important viruses. Recently, we isolated a SLEV strain from the brain of a horse with neurological signs in the countryside of Minas Gerais, Brazil. The SLEV isolation was confirmed by reverse-transcription RT-PCR and sequencing of the E protein gene. Virus identity was also confirmed by indirect immunofluorescence using commercial antibodies against SLEV. To characterize this newly isolated strain *in vivo*, serial passages in newborn mice were performed and led to hemorrhagic manifestations associated with recruitment of inflammatory cells into the central nervous system of newborns. In summary this is the first isolation of SLEV from a horse with neurological signs in Brazil.

Citation: Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, et al. (2013) Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. *PLOS Negl Trop Dis* 7(11): e2537. doi:10.1371/journal.pntd.0002537

Editor: Scott C. Weaver, University of Texas Medical Branch, United States of America

Received: February 17, 2013; **Accepted:** September 30, 2013; **Published:** November 21, 2013

Copyright: © 2013 Rosa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work in RLS lab is supported by CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – www.cnpq.br) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – www.fapemig.br). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rsantos@vet.ufmg.br

Introduction

St. Louis encephalitis virus (SLEV) is a mosquito-borne virus that causes human and animal encephalitis in the Western hemisphere. SLEV is considered endemic in the Americas, with encephalitis cases being diagnosed from Canada to Argentina [1–3]. There is no vaccine or treatment available for St. Louis encephalitis.

SLEV is a single-stranded positive sense RNA virus, with approximately 50 nm in diameter and a genome of 11 kb. SLEV is a member of the *Flavivirus* genus in the *Flaviviridae* family, together with several important pathogens such as West Nile virus (WNV), Japanese encephalitis virus (JEV), Dengue virus (DENV), Yellow fever virus (YFV) and others [4,5]. Viral life cycle is enzootic and birds are the natural amplifying host [6]. Other vertebrates (e.g. wild animals, horses, and humans) are considered accidental/final hosts [7–9].

Human infections with SLEV are mostly asymptomatic. Infected individuals can present mild malaise or flu-like symptoms, especially young or middle-aged patients [6,10]. Severe cases are clinically characterized by high fever, neurological dysfunction, altered consciousness, and headache, which are accompanied by encephalitis or meningoencephalitis that affects more often the elderly [11–13]. Lethality rates in severe cases can reach 30%, and are associated to direct damage to the central nervous system (CNS) [3]. Acute illness can be followed by prolonged convales-

cence with cognitive and psychosocial deficits for over a year [6,14]. Disease in wild or domestic animals has not been described, although many species are infected or are serologically positive for SLEV in endemic areas [6,15–19].

SLEV has been detected in Brazil for over 40 years, isolated from arthropods [19] or by serological surveys in birds [20] and mammals [18,21]. SLEV was isolated from two patients in the Amazon region in 1970's [22,23] and isolated again from a dengue-suspected patient in Southeastern Brazil, in the early 2000's [2]. Interestingly, SLEV infections in humans were identified in southeast Brazil in the following years, under an outbreak of DENV-3, together with the first a human case of DENV-3 and SLEV co-infection [24,25].

Here we describe the first isolation of SLEV from a horse with neurological signs in Brazil. SLEV identity was confirmed by molecular and serological techniques, and by inoculation of newborn mice. Our findings highlight the importance of effective arboviral surveillance.

Materials and Methods

Ethics statement

Our animal study followed national guidelines (Law number 11.794, 8/10/2008), which governs the use of animals for experimental procedures. All experimental procedures were approved and complied with the University of Minas Gerais

8.4. Anexo 4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) MAURO MARTINS TEIXEIRA,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto MECANISMOS DE DOENÇA E RESISTÊNCIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ENCEFALITE DE ST. LOUIS EM CAMUNDONGOS,

submetido a esta comissão pelo protocolo 349 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 27/03/2013.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 01/04/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br