



MARIETA TORRES DE ABREU ASSIS

“Sensibilidade do *Orthobunyavirus* do Grupo C, Oriboca (BeAn 17) aos interferons humanos”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Co-orientador: João Rodrigues dos Santos

BELO HORIZONTE
FEVEREIRO - 2009

...“ Tenha fé em Deus tenha fé na vida, tente outra vez...você tem dois pés para cruzar a ponte. Nada acabou!...Tente! Levante a sua mãe sedenta e recomece a andar, não pense que a cabeça aguenta se você parar...Queira! Basta ser sincero e desejar profundo. Você será capaz de sacudir o mundo. Vai! Tente outra vez! E não diga que a vitória está perdida. Se é de batalhas que se vive a vida. Tente outra vez!...”

(Raul Seixas)

AGRADECIMENTOS

Como começar isso aqui... bem, acho que sendo sincera já seria um bom começo rs!! Mas sinto que esses agradecimentos soarão na verdade quase como um desabafo! Fazer o quê? Eu sinto mesmo tudo isso que escreverei!

Envelheci mais que o normal nestes três anos de laboratório, é uma coisa que um dia percebi e não consigo mudar meu pensamento a respeito. Olho e nem me reconheço às vezes, o que é absolutamente aceitável neste contexto. Mas o lado bom da coisa é que talvez eu tenha crescido também e, acredito sinceramente nisso, mesmo tendo sido de uma maneira tão dura e nem tão justa. E agora eu estou aqui escrevendo meus agradecimentos como se não fosse mais ver ninguém, como se depois da defesa todos os que amo fossem mudar de planeta, ou talvez eu rsrs, como é estranho! E eu estou chorando (pra quem acha que isso é raridade, não é não... sou como todo mundo, feita de carne e osso e alguns sonhos!).

Deste tempo aqui quero levar os amigos feitos, as risadas gostosas, os dias felizes, o aprendizado e as horas loucas passadas neste ICB, porque todo o resto eu já descartei: as amizades não feitas por falta de afinidade, as pessoas ruins encontradas pelo caminho (às vezes uma pedra, quase pra atravancar o caminho e provar que Murphy existe mesmo rs), a alguma falta de profissionalismo, tudo isso eu me permiti jogar fora, para que sobrasse apenas as boas lembranças! Agora, poderei caminhar mais leve e sem pressa, com um sorriso no rosto de quem quer outra chance de recomeçar, outros sonhos. Porque as lições vindas de todos os erros, estão todas em minha mente, prontas para serem testadas. E tenho certeza que não me decepcionarei mais!

Então para começar gostaria de agradecer a Deus, que me deu o necessário para chegar até aqui e também tenho certeza, me salvou inúmeras vezes de tudo o que poderia ter sido realmente ruim durante estes três anos! Hoje chego viva e gracinha de bolsa ufa!

A meus pais e algumas pessoas da minha família como você Dindinha, quero agradecer imensamente pelo carinho, amor e apoio. Cada um de vocês soube exatamente o que me oferecer nas horas difíceis para que eu não desistisse. E não foram poucas essas vezes né mãe? Sei que vocês sofreram tanto ou mais do que eu, então eu não teria como agradecer-lhes mais. Vocês são tudo pra

mim e vai chegar um dia em que nós alcançaremos todos os nossos sonhos. Hoje, de novo vão faltar algumas pessoas da minha família aqui comigo, mas eu sei que elas estarão para sempre olhando por mim, e meu amor é eterno por elas. Mãe queria também pedir desculpas por todas as preocupações, sei que você fica doida aí comigo, especialmente pelo meu jeito de tentar aproveitar a vida e achar que o mundo está acabando! Quem sabe quando eu ficar velha eu sossego né? Você mesma fala que ser mãe é dureza, e eu entendo hehehe nunca me esqueço disso! Por hora acho que ainda demora rsrs! Você é um exemplo pra mim de dedicação e competência. Ao meu pai nem sei o que dizer...não sei se somos parecidos demais ou diferentes demais, mas eu o amo e sei que torce por mim demais! Agradeço também aos meus bebês lindos: Kíkis lindo, Lulu Ling Ling e também a Raica pão sovado (*in memorian*) rsrsrs, vocês me fazem ou fizeram muito feliz! Amo todos vocês!

Á Giliane, ainda me permito chamá-la assim, por ter me apresentado á Prof. Erna e ter me aberto esse mundo maravilhoso do conhecimento científico, tudo começou assim... ah e a Prof. Verinha também, que foi quem me apresentou para a Giliane. À Prof. Erna obrigada pela oportunidade e, também por uma conversa em particular em sua sala, nunca poderia imaginar tal cena (foi bruto como diria meu amigo Quelé!), valeu demais hoje, mais que nunca sei o significado de cada palavra dita. Ao Prof. Cláudio pela convivência e pelos artigos cedidos, sua disciplina também é a melhor, foi de suma importância para minha tese!

Ao meu chefe, olha nem sei o que te dizer... às vezes um pai, em outras horas um amigo e em algumas chefe mesmo né rsrs? Você me acolheu de braços abertos e sou infinitamente grata por isso. Fora o coração de ouro que você tem, não perca isso jamais, isso te engrandece. Também jamais esquecerei de algumas frases suas (me ajudaram muito) aquela do livro foi demais, você nem deve lembrar!

Ao Jon Jon, meu Deus, velhinho lindo você é o CARA!!!! Um homem amigo, companheiro, com pinta de pai, daqueles que dá bronca de vez em quando, chama de burrinha e bolinha, mas segundos depois dá um beijo e o melhor abraço do mundo, dizendo que nos ama! Que leva a gente pra tomar sorvete e

picolé, tomar côco depois do trabalho, pro salão de beleza, supermercado, dormir no carro porque chegou de ressaca no lab, traz comida gostosa de casa, leva também pro buteco pra tomar umas, faz massagem para dor de cabeça (e cura na hora!), pra comer a comida do Chico que ele odeia, mas leva assim mesmo, bem se eu fosse colocar tudo aqui... xiii não ia parar mais! Obrigada viu? Do coração, pela sabedoria preciosa compartilhada, pelos almoços divinos, cafés da manhã mais perfeitos ainda, regados com muito humor e discussões sem fim (aquela sobre casamento e mulher bolinha nunca vou esquecer, penso em passar fome de vez em quando e também em não casar nunquinha rrsrs). Se bem que, se eu tivesse nascido há uns 30 anos atrás, eu me casaria com tu e não sobraria nada para Olguinha meu bem rrsrs! Legal mesmo é ter que dividir você com a Lelê, Gijalma, Bárbara, Jus etc (afinal você é o homem melancia...rrsrs). Você foi o melhor co-orientador do mundo, inclusive meu despertador quando me ligava bem cedinho pra me acordar! Perfeito! E obrigada ufa, por fim pela nossa última conversa e almoço antes de suas férias, você me libertou Jon, forever (top secret não é?!) I love you so much para sempre e mais um pouco!! E não é layer hehehe!!! Ah, e eu te proíbo de tirar férias e largar a gente, de adoecer, aposentar e até de morrer!

Aos meus amigos finalmente,

Às amigas "jalmas": LeLê e Gi, vocês duas são 10! A Lelejalma nem preciso dizer o quanto te gosto, foi minha primeira amiga aqui no lab. e passamos por tudo já né?! Quantos churrascos aqui no ICB, noitadas e muitas farras! Choros também foram muitos rs e estamos aí prontas pra outra não é?! E como damos trabalho kkk! Gijalma você é uma amigona também, que bom que também tivemos a oportunidade de nos conhecermos melhor! Até morar juntas moramos... e os butecos que passamos foram inesquecíveis. Você e Chico me abriram as "portas da percepção" nunca vou esquecer do abacaxi ao contrário no sítio da Bárbara kkk (e eu digo foi bruto!) e nem também que a gente sempre vai esbagaçar demais!! Enfim vocês duas fazem parte da trupe de JR, e eu amo a convivência diária (café da manhã, almoço e trabalho com muita zoação) com vocês! Ana P também foi uma das minhas primeiras amigas aqui na Micro e ela sabe que a amo também, apesar da vida ter nos separado um pouco ultimamente sem que os motivos interessem agora rs! Obrigada pelos

conselhos que não foram poucos! Obrigada também por ter me salvado várias vezes da loucura absoluta, em uma época em que não era feliz de jeito nenhum e você era a única que sabia de tudo! Encontrei-a na noite outro dia e foi bom demais! Agradeço também à Ju BSB que é uma amiga bastante divertida e a Bárbara “ex-paulete” que sempre está de bem com o mundo (ainda vou adquirir esse status rsrs) e me deixou sozinha com os bunyavirus rsrs, que osso! Ah e as festas no seu sítio são sempre muito legais e loucas claro!

Aos amigos mais recentes e não menos importantes! Jonas “gracinha de bolsa” olha que eu ser amiga de um homem GTS seria bem difícil rsrs, mas você me conquistou! Adoro nossos cafés e prosas! Marcela e Flavinha vocês chegaram para alegrar ainda mais esse lab, adoro também! E a dança do quadrado nos espera na minha festinha! Hehehe. Rafa já era meu amigo fora do lab virou GTS rsrs e, também já fizemos algumas farras juntos, você é também é 10! Tutuxo não ia me esquecer de você! Apesar de falar “Kuait” e ser carioca te adoro também! Você é um exemplo de garra e força! Eliseu alma merece destaque né gente? Ele é quase nosso chefe rsrsrs, afinal ele é o Junior querido!! Brincadeira amigo rsrs, porque você sabe que nosso lema é zoar...deu bobeira a gente cai em cima mesmo! Obrigada pelas dicas com computadores, Excel e etc! Fique calmo e segura as pontas com seu novo amigo ou chama um gavião kkkk!!!

Aos companheiros de Lab.Vírus 4 que é quase um Mercado Central, mas eu amo! Ao Gabriel o famoso Tio, valeu pelos churrascos e festinhas insanas, você faz falta demais aqui, seu humor refinado então...! Ao Quelé valeu por me fazer rir demais com suas polêmicas frases e, também pelos churrascos fora de hora muito doidos. Nosso querido Lab.4 leva até seu nome em homenagem, precisa mais?! Ao Bruninho sempre com aquela carinha de malandro e nerd ao mesmo tempo, apresentou sua turma para eu e as meninas e, desde então tem sido aquela farra! Valeu! Ao Leo também (que é isso? Que tanto de GTS na minha vida...que carma! kkkk) você me mata de rir sempre amigo!

Ao restante do pessoal: Flavinha, Lu Garcia, Gra, Jonska! Gra valeu pelos ensinamentos com o Real Time e pelos almoços gulosos no Chico! Jonska

nem falo... já me ajudou tanto nesse lab, é um amigo precioso e prestativo desde que cheguei aqui! A outra “paulete” Lu Bessa, damos muita risada disso né?! Adoro sua visão tecnológica! Bráulio, Ruizão, Lorena, Pedro, Lu Amaral e Larissa, vocês contribuem para que o clima do lab seja sempre uma alegria! Carlinha (a mais nova “paulete”) rs já esquentamos muito nossa cabeça com aquelas benditas proteínas recombinantes kkk. Ao Geraldão o fenômeno, que sempre está disposto pra uma farrinha rs e sabe carochar já como se tivesse “nascido” na Micro!

Aos funcionários do Lab.: Tia Ângela que sempre está com aquela carinha boa e tem um humor excepcional (aquela do hipopótamo pigmeu comigo foi demais, eu ainda ando querendo um!), à Ildinha que é uma gracinha e já demos muito trabalho na casa dela coitada rs! À Andresa que é uma pessoa do bem e sem ela nada feito por aqui!

Enfim, dedico esta tese para aquelas pessoas que me fizeram sorrir nestes últimos anos... Para a galera que sempre estive junto (os lamas!!)...Para as pessoas que eu esperava que me chutassem quando caí feio, e que foram as primeiras que me ajudaram a levantar...Para as pessoas que fizeram diferença em minha vida...Para as pessoas que quando olho para trás, antes de morar em BH, e sinto muitas saudades...Para as pessoas que me aconselharam quando me senti sozinha, e me ajudaram a entender um pouco da crueldade desse mundo sem que eu tivesse mais medo ainda dele...Para as pessoas que me deram uma força quando eu não estava muito animada (não foram poucas as ocasiões...).Para as pessoas que não pude amar ...Para as pessoas que abracei de verdade...Para as pessoas que encontro apenas em meus sonhos... e para aquelas também que nem em sonho, eu quero por perto kkk (porque são essas em princípio, as que me fazem saber exatamente o que eu não quero de jeito nenhum!).

Para mim... O que importa hoje é QUEM eu tenho na vida...e não são poucas pessoas....Por isso...Guardarei todos vocês comigo!

E o mais legal de tudo, ao final desses dois anos, é que eu aprendi muitas coisas... mas a mais importante delas foi: carоче sempre amigos! Carochar é sempre um dom dos “Labvirianos”!

RESUMO

O arbovírus do grupo C Oriboca (gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*) foi isolado na Amazônia brasileira durante os anos 50. Em humanos, a doença causada por estes vírus caracteriza-se por febre alta, mialgia, dor ocular e fotofobia, com 4-5 dias de duração. Os vírus dessa família apresentam partículas esféricas, envelopadas, de 100 nm de diâmetro e o genoma é composto por três fitas simples de RNA de polaridade negativa. Os estudos envolvendo esta família viral são ainda escassos. Os interferons são uma família de citocinas e, são componentes do sistema imune inato, sendo a primeira linha de defesa contra uma infecção viral. As células infectadas sintetizam e secretam interferons do tipo I e tipo III, que sinalizam as células vizinhas para expressarem proteínas antivirais na tentativa de conter a multiplicação e evitar a dispersão desse agente, nas células do tecido infectado (estado antiviral). Assim este trabalho teve como objetivos elucidar algumas importantes características envolvendo este membro, desse importante sorogrupo da família *Bunyaviridae*, como caracterizar sua multiplicação, comparar sua reatividade cruzada através da prova de neutralização e, verificar a atividade antiviral dos IFNs do tipo I e tipo III contra este vírus. Para tal, a amostra do vírus Oriboca foi multiplicada em células Vero e, realizada a clonagem de placa para garantir uma população de vírus homogênea. A reatividade cruzada entre o Oriboca e seus clones foi investigada, utilizando-se soro anti-Apeu e soro anti-arbovírus do grupo C-1. Para avaliar a capacidade do ORIV em induzir IFN *in vitro*, utilizamos células murinas L929 e o ensaio da medida da atividade antiviral utilizado, para quantificar o IFN presente. Para avaliar a ação dos IFNs α , β e $\lambda 1$ sobre a multiplicação do vírus Oriboca, células Vero foram tratadas com concentrações variadas dos IFNs e 18 horas depois infectadas com o ORIV. Para avaliar se o uso de IFN do tipo III poderia aumentar os efeitos antivirais dos IFNs do tipo I, células VERO foram tratadas com misturas dos dois tipos de IFNs em concentrações altas ou baixas. Todas essas amostras foram posteriormente tituladas em UFP/mL. E finalmente para avaliar os níveis de expressão dos ISGs 2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA, células humanas A549 foram infectadas em diferentes tempos e o RNA total celular

extraído e utilizado como molde em reações de PCR em tempo real. Verificamos que, os IFNs α e β foram capazes de proteger as células VERO contra o ORIV. A atividade antiviral verificada foi dose dependente, e o IFN β o que mais inibiu a multiplicação do ORIV. Possivelmente, esta atividade diferencial dos IFN ocorre devido às diferenças nas afinidades às cadeias do receptor celular. O IFN- λ 1 (tipo III) foi capaz de proteger essas células também da infecção pelo ORIV, quando administrado em doses muito superiores àquelas quando comparado aos IFNs α/β . A atividade biológica dos IFNs do tipo III, mesmo redundantes com as atividades dos IFNs do tipo I, são em geral menos intensas e mais restritas. Nós observamos que, células VERO tratadas com uma combinação destes IFNs em doses altas ou baixas não tiveram um efeito antiviral aditivo sobre a multiplicação do ORIV. A expressão dos quatro ISGs (2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA), quantificados por PCR em tempo real foi aumentada nas células A549 após infecção pelo ORIV. Com este trabalho mostramos que o ORIV é sensível aos IFNs do tipo I e III em maior ou menor grau e, embora utilizem receptores distintos para sinalizarem, essas duas famílias de IFN compartilham algumas características comuns, como as vias de transdução de sinais ativadas e os estímulos requeridos para a sua produção. Esses resultados confirmam dados prévios descritos para outros *Bunyavirus*. Os dados sugerem que, o sistema imune inato desempenha um importante papel no controle do ORIV e um potencial terapêutico dos IFNs do tipo I e III no controle das arboviroses. Mais estudos serão necessários para caracterizar a sensibilidade aos IFNs do tipo I e III para outros membros da família *Bunyaviridae*, bem como avaliar outros IFNs como o tipo II (IFN γ) e também o IFN λ 2 para membros dessa família.

ABSTRACT

The group C arbovirus Oriboca (genus *Orthobunyavirus*, family *Bunyaviridae*) was isolated in the Brazilian Amazon during the years 1950. In humans, the disease caused by these viruses is characterized by high fever, myalgia, ocular pain and photophobia, which lasts 4-5 days. The virus from this family presents spherical, enveloped, of 100 nm in diameter particles and its genome is formed by three segments of single-stranded RNA of negative polarity. There are still few studies involving this viral family. The interferons are a family of cytokines and are components of the innate immune system, being the first line of defense against a viral infection. The infected cells synthesize and secrete type I and III interferons, which signal to the neighboring cells to express antiviral proteins in the attempt to hinder the multiplication and avoid this agent's diffusion in the cells of the contaminated tissue (antiviral state). Thus, this work had as aims to elucidate some important characteristics involving this member of this important serogroup of the family *Bunyaviridae*, such as characterizing its multiplication, comparing its cross reactivity by neutralizing tests and verify the antiviral activity of the types I and III IFNs against this virus. In order to do this, the Oriboca virus sample was multiplied in Vero cells and a plaque cloning was performed to guarantee a homogeneous virus population. The cross reactivity among Oriboca and its clones was investigated by using anti-Apeu serum and anti-arbovirus of the group C-1. To evaluate the capacity of the ORIV in inducing IFN *in vitro*, murine cells L929 were used and the test of the measure of the antiviral activity was used to quantify the IFN present. To assess the action of the IFNs α , β and $\lambda 1$ on Oriboca virus multiplication, Vero cells were treated with various concentrations of the IFNs and 18 hours later infected with ORIV. To evaluate whether the use of type III IFN could increase the antiviral effects of the type I IFNs, Vero cells were treated with mixtures of both types of IFN in low or high concentrations. All these samples were posteriorly titered in PFU/mL. Finally, to assess the levels of expression of the ISGs 2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA, human cells A549 were infected in different times and the total cellular RNA extracted and used as a template in real time PCR reactions. We verified that the IFNs α and β were capable of protecting the Vero cells against the ORIV. The antiviral activity verified was dose dependent, and the IFN β was the most efficient in inhibiting ORIV multiplication. Possibly, this differential activity of the IFNs occurs due to the differences in the affinity to cellular receptor chains. The IFN- $\lambda 1$ (type III) was also capable of protecting these cells from the infection with ORIV, when administered in doses much higher than the ones of IFNs α/β . The biological activity of the IFNs type III, even when redundant with the IFNs types I activities, are generally less intense and more restricted. We observed that Vero cells treated with a combination of these IFNs in high or low doses did not present an antiviral effect additive on the multiplication of ORIV. The expression of the four ISGs (2'5'OAS, PKR, 6-16 and MxA), quantified by real time PCR was raised in the A549 cells after the infection with ORIV. With this work, we showed that ORIV is sensitive to the IFNs type I and III in higher or lower level and, even though they use different receptors to signal, these two families of IFN share some common characteristics, such as pathways of signal transduction activated and the stimulus required to its production. These results confirm previous data described for other *Bunyavirus*. The data suggest that the innate immune system has an important role in the control of ORIV and a therapeutic potential of the IFNs types I and III in the control of the arbovirosis. More studies are needed in order to characterize the sensitivity of the IFNs types I and III to other members of the *Bunyaviridae* family, as well as evaluate other IFNs like the type II (IFN γ) and also the IFN $\lambda 2$ for the members of this family.

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas -----	01
Lista de figuras e tabelas -----	03
I- INTRODUÇÃO -----	04
1.1 – Arbovírus -----	05
1.1.1 – Histórico e definições -----	05
1.1.2 – Arboviroses: patogenia, manifestações clínicas e tratamento -----	06
1.1.3 – Ecologia -----	08
1.1.4 – Epidemiologia e emergência dos arbovírus -----	09
1.2 - A Família <i>Bunyaviridae</i> -----	11
1.2.1 – Estrutura e genoma do vírus -----	12
1.2.2 – Multiplicação viral -----	16
1.3 – Gênero Orthobunyavirus -----	18
1.3.1 – Orthobunyavirus do Grupo C -----	21
1.4 – Interferons -----	24
1.4.1 – Interferons do tipo I, II e III -----	28
1.4.2 – Interferons e a família Bunyaviridae -----	31
II- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA -----	33
III- OBJETIVOS -----	38
3.1- Objetivo geral -----	39
3.2- Objetivos específicos -----	39
IV- MATERIAIS E MÉTODOS -----	40
4.1- Células -----	41
4.1.1 – Células 293T -----	41
4.1.2 – Células Vero -----	41
4.1.3 – Células L929 -----	41
4.1.4 – A549 -----	41
4.1.5 – Meio de Cultura e subcultivos -----	42
4.2- Amostra de vírus -----	42
4.2.1 – Origem -----	42

4.2.2 – Produção de estoques virais	42
4.3 – Titulação de vírus	43
4.3.1 – Titulação por UFP	43
4.4 – Clonagem de vírus	43
4.5 – Anticorpos	44
4.5.1 – Ensaio de soroneutralização	45
4.6 – Ensaio de produção de IFN em células L929	45
4.7 – Atividade antiviral (FERREIRA et al.,1977)	46
4.8 – Interferons	47
4.8.1 – Obtenção do plasmídeo pSPXIIneo em grande escala... ..	47
4.8.2 – Produção de IFN lambda 1	48
4.8.3 – Titulação de IFN lambda 1 recombinante	48
4.9 – Avaliação da atividade antiviral dos IFNs	49
4.10 – Indução dos genes estimulados por IFN (ISG)	49
5.10.1 – Extração de RNA total celular	49
5.10.2 – Reação de transcrição reversa (RT)	50
5.10.3 – Reação em cadeia da polimerase- PCR em tempo real	50
V – RESULTADOS	52
5.1 – Caracterização do ORIV (BeAn17)	53
5.2 – Clonagem do ORIV	54
5.3 – Ensaio de soroneutralização	55
5.4 – Ensaio de produção de IFN em células L929 e atividade antiviral	56
5.5 – Obtenção de plasmídeo em grande escala para a produção....	57
5.6 – Produção de IFN lambda 1 recombinante	58
5.7 – Avaliação da atividade antiviral de IFNs do tipo I contra o ORIV... ..	58
5.8 – Avaliação da atividade antiviral de IFNs do tipo III contra o ORIV	61
5.9 – Co-tratamento de células VERO com IFNs do tipo I e tipo III... ..	63

5.10 – PCR em tempo real -----	64
VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES -----	68
VII– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	77
7.1- Referências bibliograficas -----	78

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L: microlitro

2'5'OAS: 2'5' oligoadenilato sintetase

6-16: proteína induzida por interferon-alfa 6

Ac: anticorpo

APEUV: vírus Apeu

ATCC: American Type Culture Collection

BUNV: vírus Bunyamwera

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CF: fixação do complemento

CMC: carboximetilcelulose

cRNA: RNA complementar

DMEM: meio mínimo de Eagle modificado por Dulbeco

dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

ECP: efeito citopático

EMCV: vírus da encefalomiocardite murina

HI: inibição da hemaglutinação

HTN: Hantavírus

HuVECs: células endoteliais de veias umbilicais humana

I.A.L: Instituto Adolfo Lutz

I.E.C: Instituto Evandro Chagas

IFN: interferon

IFNABR: receptor de interferons do tipo I

IFNGR: receptor de interferons do tipo II

IFNLR: receptor de interferons do tipo III

IRFs: fatores regulatórios de IFN

ISGs: genes estimulados por interferon

ISGF3: fator gênico estimulado por interferon 3

ISRE: elemento responsivo estimulado por interferon

Jaks: Janus quinases

LACV: vírus La Crosse

LB: meio Luria-Bertani

m.o.i.: multiplicidade de infecção

mg: miligramas
min: minutos
mL: mililitro
mM: milimolar
Mxa: homólogo humano para o gene de resistência a myxovirus 1 murino
NF-κB: fator nuclear-κB
ng: nanograma
NK: células natural killer
mRNA: RNA mensageiro
NT: neutralização
OMS: Organização Mundial da Saúde
ORF: janela aberta de leitura
ORIV: vírus Oriboca
OROV: vírus Oropouche
PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos
PBS: solução salina tamponada contendo fosfato
PCR: reação em cadeia da polimerase
PKR: proteína quinase R ativada por RNA fita dupla
pM: picomolar
PRRs: receptores de reconhecimento de padrões (PAMPs)
rpm: rotações por minuto
RT: transcrição reversa
RVFV: vírus da febre de Rift Valley
SBF: soro fetal bovino
STAT: transdutor de sinal e ativador da transcrição
Tyks: tirosinas quinases
UFP: unidades formadoras de placas
vRNA: RNA viral

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1 – Ciclo biológico dos arbovírus -----	08
Figura 2 – Partícula viral característica da família <i>Bunyaviridae</i> -----	13
Figura 3 – Genoma da família <i>Bunyaviridae</i> -----	14
Figura 4 – Ciclo de multiplicação dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i> -----	16
Figura 5 – Mapa da localização da área do estado do Pará... -----	23
Figura 6 – Relações sorológicas entre os vírus do grupo C...-----	24
Figura 7 – Representação esquemática da estimulação da expressão dos ISGs...	26
Figura 8 – Representação esquemática da via de sinalização dos IFNs...-----	27
Figura 9 – Características da multiplicação do ORIV em células VERO -----	53
Figura 10 – Curva de multiplicação do ORIV... -----	54
Figura 11 – Clonagem de placa do ORIV em células VERO -----	55
Figura 12 – Indução de IFN após infecção pelo ORIV em células L929 -----	57
Figura 13 – Fotografia do gel de agarose -----	58
Figura 14 – Atividade antiviral do IFN α 2a recombinante contra o ORIV -----	59
Figura 15 – Atividade antiviral do IFN- β recombinante contra o ORIV -----	60
Figura 16 – Curva de crescimento do ORIV em células tratadas com IFNs do tipo I	60
Figura 17 – Atividade antiviral do IFN- λ 1 contra o ORIV -----	62
Figura 18 – Curva de multiplicação do ORIV em células tratadas com IFN- λ 1 -----	62
Figura 19 – IFNs do tipo I quando combinados com IFN- λ 1 (tipo III)...-----	63
Figura 20 – IFNs do tipo I quando combinados com IFN- λ 1 (tipo III)...-----	64
Figura 21 – Níveis de 2'5'OAS em células A549 após infecção com o ORIV -----	65
Figura 22 – Níveis de PKR em células A549 após infecção com o ORIV -----	66
Figura 23 – Níveis de 6-16 em células A549 após infecção com o ORIV -----	66
Figura 24 – Níveis de MxA em células A549 após infecção com o ORIV -----	67

Tabela 1 – Bunyaviridae: gêneros, sorogrupos... -----	19
Tabela 2 - Sequências dos iniciadores e segmento genômico alvo -----	68

I – INTRODUÇÃO

1 – Arbovírus

1.1.1 - Histórico e definição

No início dos anos quarenta no século passado, Hamon e colaboradores começaram a estudar e caracterizar um grupo particular de vírus que eram transmitidos por artrópodes e causavam encefalites, os quais chamaram “arthropods borne viral encephalitis”. Esse grupo era constituído pelos vírus das encefalites de S^{to}. Louis e Japonesa, das encefalites Eqüinas do Leste e do Oeste, transmitidos por mosquitos e o vírus da Encefalite Russa, transmitido por carrapatos.

Casals & Brown pouco mais tarde em 1957, dividiram esses vírus em três sorogrupos bem definidos: sorogrupo A (membros da família *Togaviridae*), sorogrupo B (membros da família *Flaviridae*) e sorogrupo C (restrito ao gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*) que foram então denominados arbovírus como abreviatura da expressão “**arthropods borne animal viruses**”.

No Brasil, o Laboratório de Vírus de Belém foi estabelecido pelo Serviço Especial de Saúde Pública (hoje Fundação Nacional de Saúde) e pela Fundação Rockefeller em 1954 para isolar e estudar os arbovírus na região Amazônica (CAUSEY *et al.*, 1961).

Também no Estado de São Paulo (região de Mata Atlântica), desde 1961 vem sendo conduzido um programa de vigilância para os arbovírus pelo Instituto Adolf Lutz (I.A.L), da Secretaria de Saúde deste Estado, que conta com a colaboração do Instituto Evandro Chagas (I.E.C) de Belém no Pará e do Centers for Disease Control (C.D.C), Division for Vector-Borne Infectious Diseases, Fort Collins, U.S.A (IVERSSON, 1994).

Então através de estudos laboratoriais e de campo realizados por pesquisadores da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do I.E.C, durante o curso das inúmeras epidemias ocorridas na Amazônia Brasileira, os

arbovírus foram inicialmente classificados por sorologia principalmente por neutralização (NT), inibição da hemaglutinação (HI) e fixação do complemento (CF) e posteriormente confirmados por análises moleculares e morfogênese para fins taxonômicos (BEATY *et al.*, 1995).

O termo arbovírus foi introduzido por pesquisadores da Califórnia no começo da década de quarenta (KUNO & CHANG, 2005). Esses são definidos como vírus que na natureza podem infectar artrópodes hematófagos através da ingestão de sangue de vertebrados infectados. O vírus tem a capacidade de multiplicar-se nos tecidos do artrópode vetor sendo posteriormente transmitido através de picadas para vertebrados susceptíveis (MELLOR, 2000).

1.1.2 - Arboviroses: patogenia, manifestações clínicas e tratamento

As arboviroses são doenças causadas pelos arbovírus, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos, ou de hospedeiro artrópode a hospedeiro artrópode, através da via transovariana e, possivelmente, da via sexual. Essas doenças são em sua totalidade zoonoses e, mantidas em ambientes silvestres. (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Conseqüentemente, as pessoas que mantêm contato mais estreito com o ambiente silvestre, no qual se situam os nichos ecológicos dos arbovírus, são atingidas com maior frequência. Entretanto, muitas arboviroses têm surgido periodicamente em áreas urbanas, onde causam epidemias e são um problema de saúde pública mundial. A natureza da doença produzida no homem varia conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção. A maioria provoca uma síndrome febril benigna com ou sem exantema, enquanto outros determinam quadro hemorrágico ou de encefalite com elevada letalidade (LEÃO *et al.*, 1997).

O mecanismo que dá origem às manifestações clínicas e às alterações patológicas da maioria das arboviroses ainda não é suficientemente conhecido. Mas estudos experimentais demonstram que, uma vez ocorrida a transmissão, o vírus localiza-se nos gânglios linfáticos regionais da área da pele picada pelo artrópode vetor infectado. O agente viral então alcança a corrente sanguínea, através dos vasos linfáticos, disseminando-se pelos órgãos e tecidos do hospedeiro. O vírus se multiplica por sua vez nesses locais, sendo lançado novamente na corrente sanguínea, determinando a viremia que corresponde ao período febril. Em alguns casos a infecção não passa dessa fase e o paciente se recupera totalmente, outras vezes, a infecção progride para manifestações exantemáticas, neurológicas ou hemorrágicas (LEÃO *et al*, 1997; AZEVEDO *et al*, 2007).

Uma vez que as arboviroses são causadas por agentes heterogêneos, as manifestações clínicas das arboviroses em seres humanos são divididas em quatro categorias: síndrome febril, síndrome febril exantemática, febre hemorrágica e encefalite. Vale ressaltar que, um mesmo arbovírus pode determinar diferentes síndromes clínicas e, por outro lado, a mesma sintomatologia pode ser determinada por tipos diferentes de arbovírus. Este fato pode ser explicado por fatores tais como a quantidade do inoculo, tempo de exposição aos transmissores, a amostra do vírus e os fatores do hospedeiro. (BEATY *et al.*, 1995; GUBLER, 2002; LEÃO *et al*, 1997; MELLOR, 2000; NALCA *et al.*, 2003).

Não há tratamento específico para as arboviroses. O tratamento visa à manutenção do estado geral do doente. As medidas, portanto, são de suporte para manutenção das funções vitais. Medidas preventivas para as arboviroses no Brasil, exceto a dengue e a febre amarela, são escassas e as medidas individuais constituem as únicas possíveis, já que não se dispõe de vacinas e o combate aos vetores pode ser oneroso (AZEVEDO, *et al*, 2007).

1.1.3 - Ecologia

Na natureza, os arbovírus são mantidos em ciclos complexos envolvendo vetores, tais como, como mosquitos e carrapatos. Estes vetores depois de infectados, transmitem o vírus para os hospedeiros vertebrados (FIGURA 1). A infecção dos vetores é geralmente longa e com efeitos não aparentes. O ciclo é completado pela infecção de novos artrópodes que se alimentam do sangue dos vertebrados que estejam apresentando viremia. A transmissão vertical também pode ocorrer pela via transovariana (FIGUEIREDO, 2007).

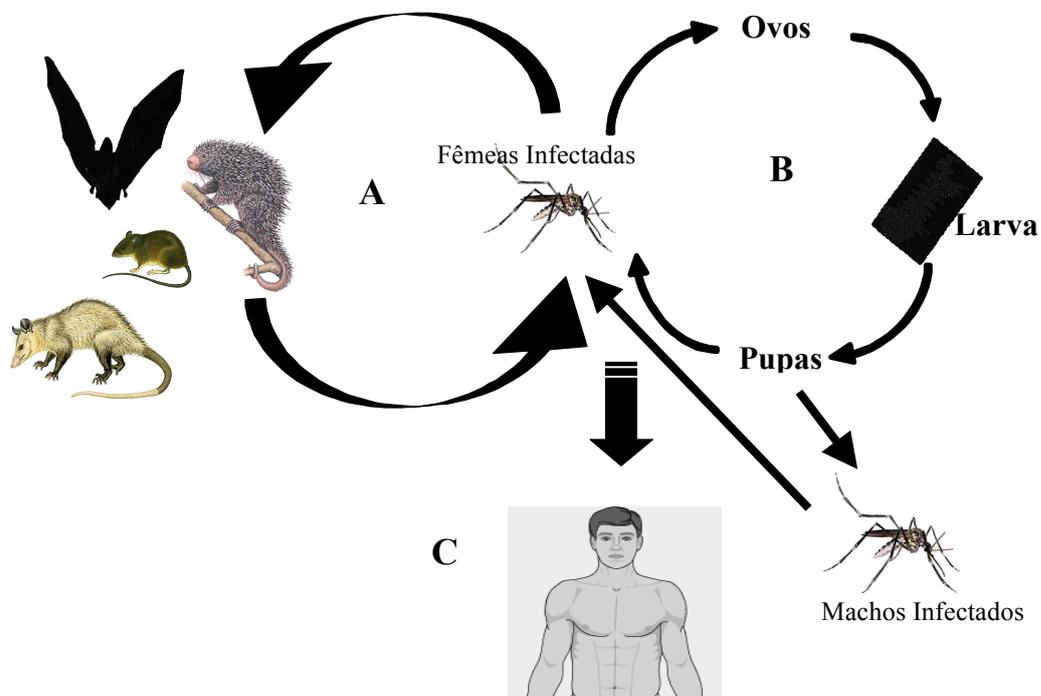


Figura 1 – Ciclo biológico dos arbovírus. A – Ciclo de amplificação em mamíferos, na qual a fêmea infectada poderá transmitir o vírus para pequenos mamíferos que, por sua vez, desenvolvem uma curta, mas alta viremia, podendo levar a infecção de artrópodes hematófagos, já infectados ou não. B – Ciclo reservatório, na qual ocorre a transmissão transovariana e venérea. C - Infecção humana acidental.
Fonte: NOVAES, 2006.

Em sua maioria as arboviroses são zoonoses, que dependem de espécies animais para se manterem na natureza. Humanos são geralmente hospedeiros terminais ou acidentais, não sendo, portanto, necessários para a manutenção desses vírus na natureza (GUBLER, 2002).

Os arbovírus apresentam distribuição mundial, mas a maioria é encontrada em áreas tropicais, onde as condições climáticas são favoráveis. Vale ressaltar que o Brasil é um grande país tropical e ainda possui um terço de seu território recoberto por florestas tropicais e outros ecossistemas, apesar da elevada taxa de desmatamento. Essas condições, aliadas a existência de grandes cidades populosas, fornecem condições ideais para a existência de muitas arboviroses que são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos (AZEVEDO *et al*, 2007; FIGUEIREDO, 2007).

Os hospedeiros mais importantes nas arboviroses, e de impacto para a saúde pública, são os pássaros e roedores. Os vetores artrópodes mais importantes por sua vez, são os mosquitos e carrapatos (GUBLER, 2002).

Muitos arbovírus podem causar doenças severas no homem e também animais como, por exemplo, a febre amarela, a dengue hemorrágica e várias encefalites (GOULD *et al*, 2006). No Brasil, doenças transmitidas por mosquitos constituem importantes doenças infecciosas emergentes, sendo consideradas, portanto, um problema de saúde pública (TURELL *et al.*, 2006).

1.1.4 – Epidemiologia e emergência dos arbovírus

Os arbovírus são taxonomicamente diversos, pertencendo a 8 famílias e 14 gêneros. Atualmente, existem 534 vírus registrados no “*Catalogue of Arboviruses and Certain Other Viruses of Vertebrates*”, dos quais 134 são conhecidos por causarem doenças em humanos e aproximadamente 40 por infectarem animais. Com relação a infecções humanas, os mais importantes arbovírus causadores de doença pertencem às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (BEATY *et al.*, 1995; MELLOR, 2000; GUBLER, 2002; NALCA *et al.*, 2003).

No Brasil 195 diferentes espécies foram identificadas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) no período de 1954 a 2003 na região Amazônica. Trinta e quatro destes agentes são comprovadamente patogênicos ao homem. Infecção

humana por 30 desses vírus já foi demonstrada mediante o isolamento do agente do sangue de doentes. Os arbovírus encontrados na Amazônia são distribuídos em 21 grupos sorológicos e, cerca de dois terços destes foram isolados antes que o fossem em qualquer outra parte do mundo. Muitos deles jamais foram encontrados fora dessa região (AZEVEDO *et al*, 2007).

Alguns desses vírus são de importância para a saúde pública devido à habilidade em causar doença severa ou mesmo a morte, pois estão também envolvidos em epidemias como é o caso do vírus da dengue, da febre amarela e ainda o vírus Oropouche. Este último é considerado a arbovírus que mais acomete o homem na Amazônia depois da dengue. Estudos soropidemiológicos realizados no Brasil e nas Américas indicam várias epidemias entre 1961 e 2007, com aproximadamente 357000 infectados (NUNES *et al*, 2007).

Vários artrópodes hematófagos podem servir como vetor para um arbovírus, sendo os mais conhecidos os mosquitos, carrapatos, flebótomos (*Phlebotomus*, *Sergentomya* e *Lutzomya*), maruins ou mosquito pólvora (*Culicoides*), percevejos (*Oeciacus*) e possivelmente ácaros (BEATY *et al.*, 1995).

Os ciclos enzoóticos são geralmente causados por humanos ou animais que invadem o ciclo natural silvestre, porém envolvem casos esporádicos. Já os ciclos epizoóticos envolvem epidemias significantes, que são o resultado da introdução de um arbovírus numa população de vertebrados susceptíveis, associado com uma população de vetores competentes (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

As arboviroses são sazonais, dependendo direta ou indiretamente da estação do ano na qual o artrópode se alimenta de sangue. As principais influências são os fatores climáticos (chuvas, temperaturas), a competência do vetor, o período de incubação intrínseca e extrínseca, a densidade de vetores, o transporte de vírus a lugares distantes e o estado imunológico da população, hospedeiros vertebrados (SHOPE, 1993).

A emergência e re-emergência das arboviroses podem ser um fenômeno natural relacionado à evolução e adaptação das espécies. Porém, mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem contribuir para esse fenômeno. Podemos citar algumas atividades humanas que podem influenciar esta emergência: aumento do transporte de animais, humanos, plantas, artrópodes e outros materiais; aumento de atividades de lazer no campo; redução ou não existência de controle de artrópodes; urbanização crescente; desmatamento; atividades militares; desastres naturais; mudanças climáticas. O risco de novas arboviroses está relacionado com a existência de grandes cidades, densamente povoadas, que são infestadas por mosquitos tais como *Culex* e o antropofílico *Aedes aegypti* (GOULD, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

A elevada incidência de arbovírus na Amazônia brasileira certamente decorre das condições ecológicas extremamente favoráveis que a região oferece para a manutenção desses agentes: alta densidade e diversidade de insetos hematófagos e de animais silvestres que constituem elementos indispensáveis à propagação dos arbovírus (PINHEIRO *et al.*, 1983).

Dentre os arbovírus estão os vírus da família *Bunyaviridae*, que são os únicos cujo espectro de hospedeiros inclui invertebrados, vertebrados e plantas. E todas aquelas mudanças supracitadas, têm favorecido os membros desta família a se tornarem importantes agentes infecciosos emergentes e re-emergentes (NICHOL *et al.* 2000; GONZALEZ-SCARANO *et al.*, 2005). Estes são classificados na categoria A (alto risco) pelo comitê de medidas de prevenção a patógenos emergentes do “Centers for Disease Control” (CDC) (BARR *et al.*, 2005).

1.2 – A família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* foi estabelecida em 1975, e abrange um grande número de vírus que compartilham propriedades antigênicas e morfológicas, com base em suas reações sorológicas cruzadas. Esta constitui um grupo diverso de vírus RNA dividida em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*,

Nairovirus, *Phlebovirus* e *Tospovirus*, compreendendo mais de 350 membros. Os 4 primeiros gêneros compreendem vírus que infectam animais e o último compreende vírus que infectam plantas. Membros dessa família são distribuídos em todo o mundo e, muitos são considerados vírus emergentes que têm causado um elevado número de epidemias. (BISHOP *et al.*, 1980; GONZALEZ-SCARANO *et al.*, 2005; LOWEN, 2005; OVERBY *et al.*, 2008).

A maioria dos *bunyavirus* é difundida na natureza por ciclos de transmissão selvagens entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos, incluindo mosquitos, flebótomos, carrapatos e maruins. O vírus bunyamwera (BUNWV) é o protótipo da família *Bunyaviridae* e também do gênero *Orthobunyavirus*, sendo primeiramente isolado de mosquitos coletados em Uganda em 1943. (BOWEN *et al.*, 2001; LÉONARD, *et al.*, 2006; LOWEN *et al.*, 2005). Em adição exemplos tais como La Crosse vírus, Rift Valley Fever vírus, Crimean-Congo hemorrhagic fever vírus e Sin Nombre vírus causam doença severa em humanos incluindo febre hemorrágica e encefalite (OVERBY *et al.*, 2008).

1.2.1 - Estrutura e genoma do vírus

A família *Bunyaviridae* consiste de vírus envelopados com forma esférica de 80 a 120 nm de diâmetro. Formas alongadas podem também ser observadas, como no caso dos *Hantavirus*. Estes vírus possuem ainda glicoproteínas de superfície, conhecidas como Gc e Gn, de 5 a 10 nm que estão ancoradas na bicamada lipídica do envelope. O genoma inserido no capsídeo é composto por três fitas simples de RNA de polaridade negativa, denominadas pelo seu tamanho: pequeno S (“small”), médio M (“medium”) e grande L (“large”). Os segmentos encontram-se circularizados devido à presença, nas extremidades 3’ e 5’, de aproximadamente 15 nucleotídeos complementares. Estas seqüências nas extremidades são altamente conservadas entre os vírus do mesmo gênero, mas diferem daqueles de outros gêneros. Cada um destes segmentos encontra-se envolvido por nucleoproteínas, denominadas proteínas N, que em associação com a polimerase, proteína L, constituem os

ribonucleocapsídeos (FIGURA 2) (BISHOP et al., 1980; ELLIOTT, 1990; GRIOT et al., 1993; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; MAGALHÃES et al, 2007; OVERBY et al, 2008).

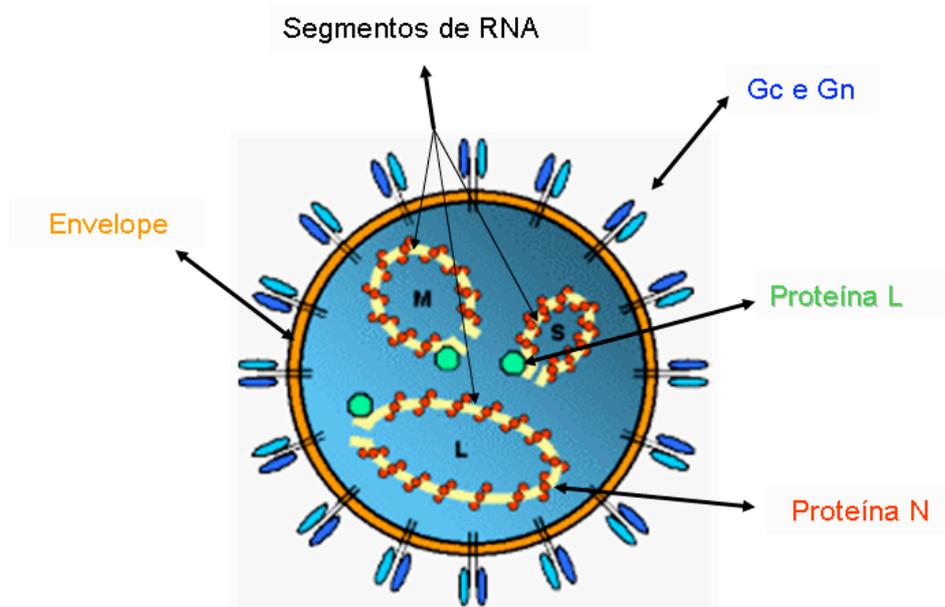


Figura 2 – Partícula viral característica da família *Bunyaviridae*. Os três segmentos genômicos (S, M e L) estão complexados com a proteína N para formar os nucleocapsídeos. O nucleocapsídeo e a polimerase viral estão empacotados dentro de um envelope lipídico contendo as glicoproteínas Gn e Gc..

Fonte: http://www.uk>uni-freiburg.de/.../interferon_antagonistic.htm

Os membros da família *Bunyaviridae* não codificam uma matriz protéica, em contraste com outras famílias de vírus RNA. Acredita-se que a estrutura do vírus é estabilizada pela interação direta dos nucleocapsídeos com o envelope ou com os domínios citoplasmáticos das glicoproteínas inseridas no envelope (ELLIOTT, 1990; OVERBY et al, 2008). O genoma codifica quatro proteínas estruturais comuns a todos os membros da família: a polimerase viral codificada pelo segmento L; as duas glicoproteínas de superfície Gn (ou G2) e Gc (ou G1) codificadas pelo segmento M (que primeiramente codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em Gn e Gc); a proteína N codificada pelo segmento S (FIGURA 3). Os vírus dos gêneros *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* também codificam proteínas não-estruturais,

presentes no segmento M (NSm) ou no segmento S (NSs), por diferentes janelas de leituras (ORF) (GONZALEZ-SCARANO *et al.*, 2005; SALANUEVA *et al.*, 2003; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; WEBER *et al.*, 2002b; KOHL *et al.*, 2006).

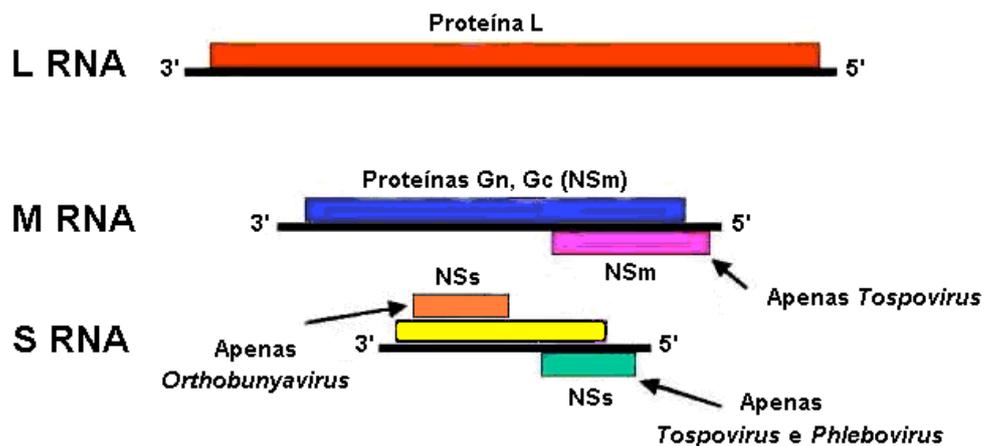


Figura 3 – Genoma da família *Bunyviridae*. Segmento L: origina a proteína L ou RNA-polimerase RNA-dependente. Segmento M: origina as glicoproteínas Gn e Gc e a proteína não estrutural NSm. Segmento S: origina a proteína N e a proteína não estrutural NSs. Somente os vírus dos gêneros *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* codificam as proteínas não estruturais. *Orthobunyavirus*, *Hantavirus* e *Nairovirus* utilizam estratégia codificadora senso-negativo enquanto *Phlebovirus* e *Tospovirus* estratégia ambisenso. Fonte: adaptado de www.uct.ac.za/microbiology/tutorial/

O segmento L codifica por meio de uma única janela de leitura, a RNA polimerase dependente de RNA ou proteína L, responsável pela transcrição e replicação do genoma. Há evidências de que essa proteína também esteja envolvida com propriedades biológicas dos vírus, como virulência e espectro de hospedeiros (BISHOP *et al.*, 1980; ELLIOTT, 1990; GRIOT *et al.*, 1993; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

O segmento M codifica em uma única janela de leitura, uma poliproteína, esta é clivada, em um evento pós-traducional, resultando nas glicoproteínas, Gn (G2) e Gc (G1), e na proteína não estrutural NSm (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

As glicoproteínas de membrana desempenham papel na adsorção dos vírus às células, sendo que a glicoproteína Gc é a principal responsável pela adsorção do vírus às células dos vertebrados, enquanto que Gn é a principal responsável pela adsorção do vírus às células dos vetores artrópodes, já que Gc é rapidamente clivada pelas enzimas proteolíticas existentes no intestino do vetor. Em seguida, ao entrar na célula via endossomos, o genoma do vírus é liberado no citoplasma quando há a fusão do envelope viral com a membrana celular em um fenômeno mediado pelas mudanças conformacionais sofridas pela glicoproteína Gc em pH ácido. Com relação à virulência e à infectividade, estudos demonstraram que os principais determinantes dessas características estão presentes no segmento M, principalmente na glicoproteína Gc, influenciando no tipo de célula ou órgão alvo, na eficiência da transmissão do vírus por um determinado artrópode e na patogênese. Por fim, as glicoproteínas de membrana induzem e interagem com anticorpos neutralizantes, sendo que estes anticorpos reconhecem principalmente a proteína Gc e anticorpos contra esta proteína resultam em uma efetiva imunidade humoral (ELLIOTT, 1990; GRIOT *et al.*, 1993; PEKOSZ *et al.*, 1995; PLASSMEYER *et al.*, 2005; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

Por último, o segmento S codifica em janelas de leituras sobrepostas a proteína estrutural N e, a proteína não estrutural NSs. Os vírus dos gêneros *Tospovirus* e *Phlebovirus* codificam a proteína NSs utilizando uma estratégia ambisense. A proteína estrutural N é o produto viral de maior abundância nas células infectadas, sendo responsável pelas reações sorológicas de fixação de complemento. Ela é também a proteína mais conservada na família, apresentando 40% de homologia dentro de cada gênero e 80% dentro de cada sorogrupo. Além disso, essa proteína desenvolve importante papel protegendo o RNA da degradação e controlando a atividade da polimerase durante a transcrição e replicação (GRIOT *et al.*, 1993; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

Já a proteína NSs encontra-se acumulada no citoplasma, embora pequenas concentrações sejam encontradas no interior do núcleo das células infectadas. Essa proteína atua como um fator de virulência, inibindo a síntese proteica da célula hospedeira, incluindo a síntese de interferons. Além disso, essa proteína

também controla a atividade da polimerase viral e funciona como supressor do RNA interferente (RNAi), um importante mecanismo celular antiviral (WEBER *et al.*, 2001; PLASSMEYER *et al.*, 2005; LÉONARD *et al.*, 2006; BLAKQORI *et al.*, 2007).

1.2.2 – Multiplicação viral

A multiplicação dos vírus da família *Bunyaviridae* ocorre inteiramente no citoplasma e se inicia com a adsorção da partícula viral à célula-alvo (FIGURA 4). Esse passo é mediado pela interação das glicoproteínas virais, Gn e Gc, com os receptores celulares e, independente do tipo de célula, ambas são necessárias para a adsorção, devido à conformação resultante da dimerização de Gc e Gn. Os receptores celulares ainda não foram identificados, para a maioria dos vírus da família. (SONG *et al.*, 2005; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

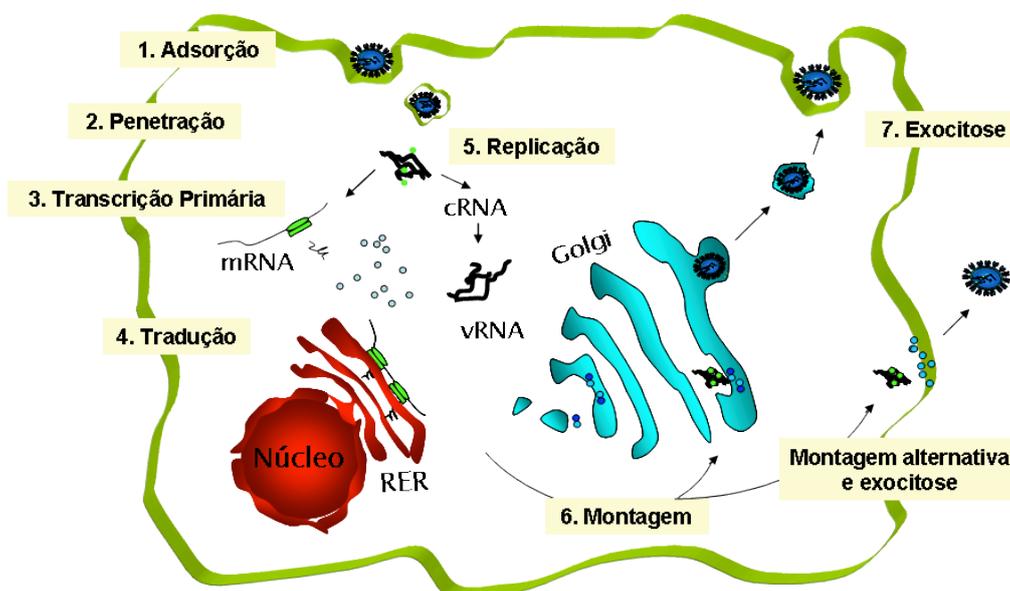


FIGURA 4 - Ciclo de multiplicação dos vírus da família *Bunyaviridae*. 1- Adsorção das partículas virais à superfície da célula; 2- Penetração por endocitose seguida por fusão de membrana, permitindo a liberação no citoplasma dos nucleocapsídeos e da polimerase viral; 3- Transcrição primária; 4- Tradução das proteínas virais; 5- Replicação do vRNA através de um cRNA intermediário; 6- Montagem das partículas no Golgi; 7- Exocitose das partículas do Golgi. RER: Retículo endoplasmático. Alguns vírus da família utilizam uma montagem alternativa, brotando diretamente da membrana plasmática. Fonte: adaptado de SCHMALJOHN *et al.*, 2007.

O próximo passo é a entrada do vírus por endocitose e, conseqüente, acidificação dos endossomos, promovendo mudanças conformacionais em Gc que resultam na fusão das membranas virais e celulares e na liberação, no citoplasma, do genoma e da polimerase viral. Apesar de Gc desempenhar importante e principal papel na fusão, estudos revelam que é necessária a associação das duas glicoproteínas para que esse processo ocorra, provavelmente porque sem essa associação Gc não apresenta a conformação correta (PLASSMEYER *et al.*, 2005; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; OVERBY *et al.*, 2008).

Em seguida, a transcrição primária do RNA viral (vRNA), de senso negativo, em mRNA, de senso positivo, é iniciada pela interação da polimerase viral (proteína L) com os três nucleocapsídeos. Somente segmentos envolvidos pela proteína N, ou seja, nucleocapsídeos servem como molde na transcrição. A síntese do mRNA ocorre utilizando iniciadores, denominados de “cap”, que são clivados de mRNAs citoplasmáticos do hospedeiro. Essa clivagem dos mRNAs do hospedeiro é executada pela atividade de endonuclease presente na proteína L do vírus. Assim, a extremidade 5' dos mRNAs apresentam de 10 a 20 nucleotídeos que não são encontrados no vRNA. Outra diferença, é que o mRNA apresenta na extremidade 3' uma seqüência truncada de aproximadamente 100 nucleotídeos que acredita-se serem terminações transcricionais (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

A tradução dos mRNAs ocorre imediatamente após a infecção, sendo os mRNAs dos segmentos L e S traduzidos em ribossomos livres no citoplasma e os mRNAs do segmento M nos ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso, na qual também ocorre as primeiras glicosilações das glicoproteínas. A replicação do genoma viral ocorre por meio da síntese e encapsidação do RNA complementar (cRNA) que servirá de molde para a síntese do vRNA. Os fatores envolvidos na mudança da transcrição primária para a replicação do genoma não são bem entendidos, mas estudos sugerem que a síntese contínua de proteínas, principalmente a proteína N, e a encapsidação do cRNA estejam envolvidos no sinal de supressão da transcrição primária.

Por fim, acontece a montagem das partículas no complexo de Golgi. Nessa etapa, os nucleocapsídeos se acumulam na parte citoplasmática da membrana do Golgi, enquanto que as glicoproteínas sofrem glicosilações terminais e se acumulam na parte luminal da membrana. Assim, ocorre o brotamento dentro das cisternas do complexo de Golgi, a membrana do hospedeiro modificada é adquirida e as partículas virais recém formadas são, então, transportadas dentro de vesículas citoplasmáticas para fora desse compartimento até a membrana celular, onde serão liberados por exocitose. Alternativamente, alguns poucos vírus da família, como o vírus Sin Nombre, brotam diretamente da membrana citoplasmática, adquirindo o seu envelope nesse momento (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

1.3 - Gênero *Orthobunyavirus*

O gênero *Orthobunyavirus* é o maior dentro da família *Bunyaviridae*, incluindo 174 vírus, sendo que 60 desses são causadores de doenças em humanos (HART *et al*, 2008). O critério para classificação nesse gênero é baseado nas características sorológicas, bioquímicas e genéticas em comum apresentadas pelos vírus. Além disso, o gênero apresenta 18 sorogrupos divididos de acordo com relações sorológicas definidas por meio de testes de fixação de complemento, que distinguem grupos específicos com base em antígenos existentes na proteína N (TABELA 1) (AQUINO *et al.*, 2002; YANASE *et al.*, 2003; WEIDMANN *et al.*, 2003).

Os ensaios sorológicos como inibição de hemaglutinação (HI), fixação de complemento (CF) e neutralização (NT) sempre foram amplamente utilizados no diagnóstico de infecções pelos *Orthobunyavirus*. Os antígenos para HI são extraídos do soro, cérebro e outros órgãos de camundongos infectados e o método é muito sensível, embora reações cruzadas possam ser observadas entre vírus do mesmo grupo. O método de CF é mais específico que o da HI e detecta anticorpos que aparecem usualmente duas semanas após o começo da doença, podendo persistir por longo tempo (pelo menos 2 anos) com títulos moderados ou altos. A NT é baseada na inibição da infectividade viral pela

ação de anticorpos, que têm alta especificidade e podem ser medidos *in vivo* ou *in vitro* (AQUINO *et al.*, 2002) e é considerado o padrão ouro para o estudo sorológico dos arbovírus (ZELENÁ *et al.*, 2008).

O diagnóstico das infecções tem sido feito, frequentemente, pelo método denominado Mac-Elisa, que permite o diagnóstico presuntivo de infecção recente através da detecção de IgM de uma única amostra obtida na fase aguda. Já nos anos 90, métodos de RT-PCR foram introduzidos para o diagnóstico dos *Orthobunyavirus*, principalmente dos sorogrupos Califórnia e Bunyamwera (AQUINO *et al.*, 2002).

Tabela 1 - *Bunyaviridae*: gêneros, sorogrupos, número de vírus incluídos e exemplares.

Gênero	Sorogrupo	Número	Exemplos	
<u>Orthobunyaviru</u>	Anopheles A	12	Tacaiuma	
	Anopheles B	2	Boracéia	
	Bakau	4	Bakau	
	Bunyamwera	32	Bunyawera	
	Bwamba	2	Buwamba	
	C	14	Caraparu, Nepuyo, Oriboca	
	Califórnia	14	La Cross, Tahyna, Snowshoe	
	Capim	10	BeAn 8582	
	Gamboa	8	Gamboa, Pueblo Viejo	
	Guama	12	Guama, Moju	
	Koongol	2	Koongol, Wongal	
	Minatitlan	2	Palestina	
	Nyando	6	Nyando	
	Olifantsvlei	5	Dabakala	
	Patois	6	Patois, Babahoya	
	Simbu	24	Acabane, Oropouche	
	Tete	5	Bahing, matruh	
	Turlock	5	Turlock, Lednice	
	<u>Phebovirus</u>	Sandfly fever	4	Sandfly fever Naples, Toscana
		Buiaru	2	Bujaru, Munguba
Candiru		6	Itaituba, Turuna	
Chilibre		2	Chilibre, Cação	
Frijoles		2	Frejoles, Joa	
Punta Toro		2	Punta Toro, Buenaventura	
Rift Valley		3	Rift Valley	
Salehadad		2	Salehadad	
<u>Hantavirus</u>		Hantaan	8	Hantaan, Puumala, Laguna
	<u>Nairovirus</u>	CCHF	3	CCHF
Dera Ghazi		6	Abdu Hammad	
Hughes		10	Punta Salinas	

	Nairobi	2	Nairobi
	Qalyub	3	Bakel, Omo
	Sakhalin	7	Avalon, Tillamook
<u>Uukuvirus</u>	Uukuniemi	12	Uukuniemi
	Não	84	
Total		350	

Fonte: adaptado de GÓNZALES-SCARANO *et al*, 1996.

As doenças produzidas pelos membros desse gênero variam desde febre (vírus Tahyna), artralgia febril (vírus Oropouche), encefalites (vírus La Crosse) e, como recentemente relatado, febre hemorrágica (vírus Nigari). Embora a maioria das infecções possua sintomas brandos, algumas podem levar à morte (WEIDMANN *et al.*, 2003; NUNES *et al*, 2007; AZEVEDO *et al*, 2007).

No Brasil, o vírus Oropouche, do sorogrupo Simbu, é a segunda arbovirose mais importante no país, sendo responsável por diversos surtos epidêmicos e uma grande morbidade (NUNES *et al*, 2007). Na região Amazônica, encontra-se uma imensa variedade de orthobunyavirus causadores de doenças ao homem. Inquéritos sorológicos realizados nesta região revelam a presença de anticorpos para diversos arbovírus e, a média de percentuais de anticorpos inibidores da hemaglutinação ou neutralizantes para alguns destes são: vírus Mucambo (6%), vírus Caraparu (5,3%), vírus Murutucu (2,3%) e vírus Oriboca (1,7%) (AZEVEDO *et al*, 2007).

Ainda, vale ressaltar, os vírus do sorogrupo C, que foram isolados durante estudos realizados nessa região e são conhecidos por causar doenças febris em humanos. Apesar de terem sido isolados a mais de quatro décadas e serem considerados vírus emergentes em potencial, pouco se sabe a respeito dos vários aspectos da biologia, patogenia e epidemiologia desses vírus (AQUINO *et al.*, 2002; WEIDMANN *et al.*, 2003).

1.3.1 – *Orthobunyavirus* do Grupo C

Na década de 1950, houve uma intensa migração de trabalhadores dos demais estados do Brasil para o estado do Pará, no intuito de desmatar as florestas existentes nessa região e transformá-las em grandes plantações. O intenso contato dos trabalhadores dessa região com as florestas propiciou a emergência de surtos e epidemias virais à cercania da capital, Belém, sendo relevantes os números de casos atribuídos às arboviroses inespecíficas ou não caracterizadas.

Assim desde 1954, data em que foi fundado o Laboratório de Vírus de Belém, com a finalidade de isolar e estudar as arboviroses na região Amazônica, os pesquisadores envolvidos no projeto conseguiram isolar mais de 10000 amostras pertencentes a pelo menos 183 diferentes tipos de arbovírus. Desse total, 157 foram isolados pela primeira vez no Brasil (LEÃO *et al.*, 1997). Essas amostras foram obtidas de pacientes com doenças febris, de animais sentinelas, de animais selvagens e de artrópodes vetores (CAUSEY *et al.*, 1961).

As amostras de vírus isoladas foram liofilizadas, e juntamente com os correspondentes anticorpos neutralizantes foram enviadas para a Fundação Rockefeller, em Nova Iorque, na qual estudos sorológicos e comparações com materiais de outras partes do mundo foram realizados. Desses estudos, concluiu-se que 451 amostras de arbovírus compreendiam 18 sorotipos, sendo que 10 pertenciam a sorogrupos já conhecidos, como os sorogrupos A, B, Bunyamwera e Califórnia. Dos restantes, sete mostraram constituir dois novos sorogrupos designados como grupos C e Guamá; e um (Tacaiuma) não foi agrupado naquele momento (TABELA 2). Hoje, sabe-se que o vírus Tacaiuma pertence ao sorogrupo *Anopheles* A (CAUSEY *et al.*, 1961; FIGUEREDO, 1999).

Cerca de 205 amostras, correspondiam a vírus pertencentes ao sorogrupo C, que até o momento eram desconhecidos, demonstrando a importância e a intensa circulação desses vírus na região Amazônica (CAUSEY *et al.*, 1961).

Após esse estudo, outros vírus pertencentes ao sorogrupo C foram isolados no Brasil, bem como em outros países. São eles: vírus Itaquí, isolado em Belém no Brasil (SHOPE *et al.*, 1961), vírus Madrid e Ossa no Panamá, vírus Nepuyo em Trinidad-Tobago e no Brasil (SHOPE & WHITMAN, 1966), vírus Restan em Trindade, Tobago e Suriname (JONKERS *et al.*, 1967) e vírus Gumbo-Limbo nos Estados Unidos (SHOPE, 1993).

Atualmente, o sorogrupo C é composto por 14 vírus: Apeu, Caraparu, Itaquí, Madrid, Marituba, Murucutu, Oriboca, Ossa, Restan, Gumbo-Limbo, Nepuyo, Vincés, Bruconha e 63U11 (NUNES *et al.*, 2005).

Os vírus do grupo C receberam seus nomes de acordo com o local em que foram identificados. A exceção é o vírus Caraparu, que foi denominado de acordo com o nome do primeiro paciente do qual foi isolado. O vírus Oriboca foi um dos primeiros a ser reconhecido do Grupo C e, o protótipo BeAn17, foi obtido na floresta de Oriboca de uma macaco sentinela em dezembro de 1954 (FIGURA 5) (CAUSEY *et al.*, 1961; ROSATO *et al.*, 1974).

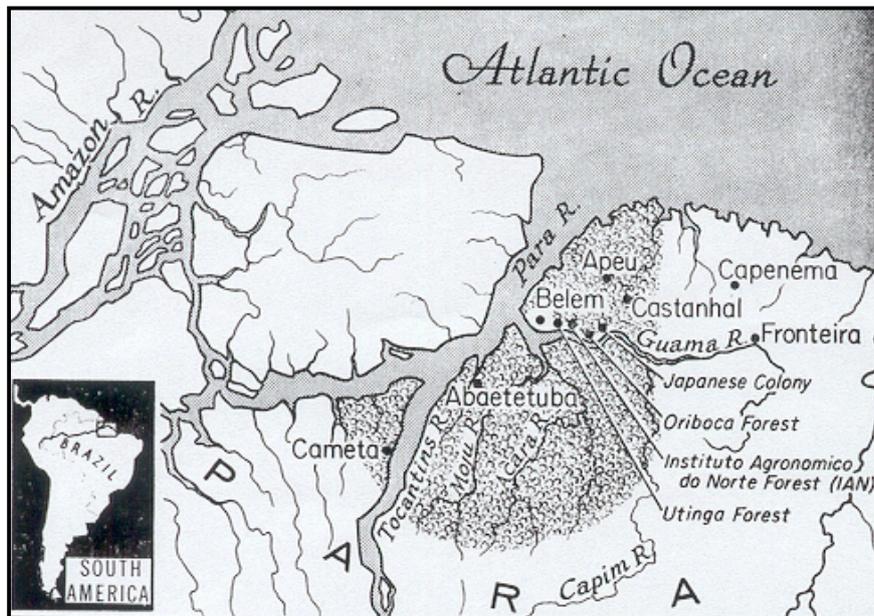


Figura 5 – Mapa da localização da área do estado do Pará estudado nos anos de 1954 a 1959, na qual foram isoladas as 451 amostras de arbovírus.

Fonte: CAUSEY *et al.*, 1961.

Shope e colaboradores testaram por provas sorológicas (HI, NT, CF) as 200 amostras do grupo C isoladas. Eles verificaram que, de acordo com o tipo de prova sorológica empregada, os sorotipos em análise (Apeu, Caraparu, Itaquí, Marituba, Murutucu e Oriboca) apresentavam afinidades diferentes entre si. Em reações de CF, os grupos com maior identidade eram: Murutucu/Oriboca, Itaquí/Caraparu e Marituba/Apeu. Já nas provas de HI e NT, os grupos afins eram Oriboca/Itaquí, Apeu/Caraparu e Marituba/Murutucu (FIGURA 6) (SHOPE *et al.*, 1962).

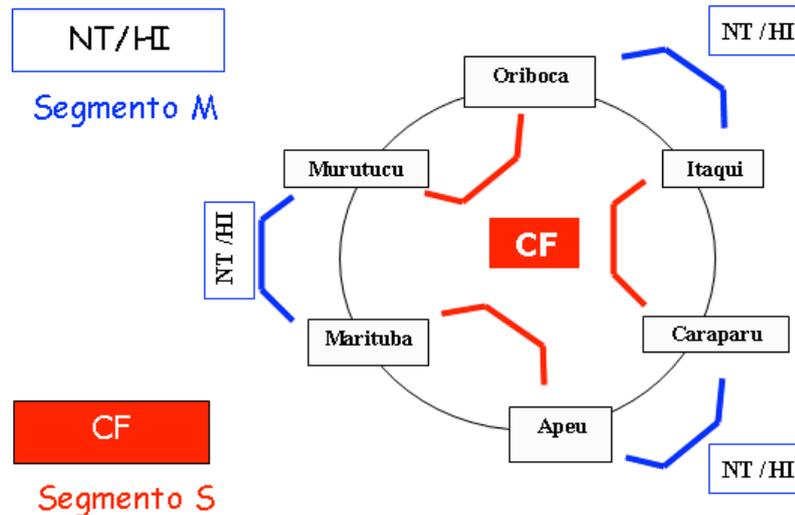


Figura 6 – Relações sorológicas entre os vírus do grupo C: Apeu, Caraparu, Itaqui, Marituba, Murutucu e Oriboca.

Fonte: SHOPE *et al.*, 1962 adaptado por MAGALHÃES, 2004.

O diagnóstico das infecções pelos *Orthobunyavirus* do grupo C consiste, até hoje, dos resultados obtidos desses três testes sorológicos (CF, HI, NT). No entanto, reações cruzadas podem ocorrer entre vírus de um mesmo sorogrupo. Além disso, o diagnóstico é laborioso e demorado, sendo confirmado apenas quando o paciente já está se recuperando. Desse modo, os métodos sorológicos são de grande utilidade, mas não são os mais adequados para um diagnóstico rápido durante a fase aguda da infecção (AQUINO *et al.*, 2002).

A partir de 1990, foi introduzido o uso de métodos utilizando a RT-PCR para o diagnóstico dos *Orthobunyavirus*, principalmente para os sorogrupos Califórnia e Bunyamwera. No entanto, a grande maioria dos vírus do grupo C ainda carece da caracterização do seu genoma, assim como aquela relacionada aos vários aspectos da biologia, patogenia e epidemiologia (AQUINO *et al.*, 2002).

1.4 – Interferons

Os interferons foram inicialmente descritos como moléculas capazes de interferir com a multiplicação do vírus Influenza *in vitro* e caracterizados por

Isaacs e Lindenman na década de 1950. Esta família de citocinas, agora é reconhecida como o componente chave do sistema imune inato e, a primeira linha de defesa contra uma infecção viral. Os IFNs possuem também importantes funções imunomodulatórias e atividades fisiológicas (ALMEIDA *et al*, 2008; SADLER *et al*, 2008).

Estes são sintetizados por células infectadas por vírus após estímulos de receptores que reconhecem padrões moleculares (PRRs). Assim, interagem com células vizinhas, estabelecendo nestas um estado de defesa antiviral, que limita a disseminação dos vírus. Os PRRs reconhecem e se ligam aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e esta interação, leva à ativação de fatores de transcrição tais como NF- κ B (fator nuclear- κ B) e fatores regulatórios de IFN (IRFs). Estas proteínas regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e IFNs do tipo I respectivamente (FIGURA 7) (ANK *et al*, 2006; ALMEIDA *et al*, 2008; BONJARDIM, 2008).

As atividades biológicas dos IFNs são associadas com a indução de diversos genes conhecidos como ISGs (genes estimulados por interferon) que incluem proteínas relacionadas com atividade antiviral, processamento de antígenos, sinalização, quimiocinas, GTPases, ciclo celular, modulação da resposta imune, apoptose, dentre outros fatores (COELHO *et al*, 2006). Para isto, os IFNs se ligam a seus receptores celulares, desencadeando uma cascata de transdução de sinal que regula a transcrição dos ISGs. A ativação dos ISGs ocorre quando o IFN se liga ao seu receptor celular, que ativa Janus quinases (Jacks) ou tirosinas quinases (Tyks). Estas quinases ativadas, fosforilam transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STATS), que vão para o núcleo e se ligam a seqüências específicas DNA presentes nos promotores dos ISGs (FIGURA 8) (SEN, 2001, UZÉ, 2007, BONJARDIM, 2008).

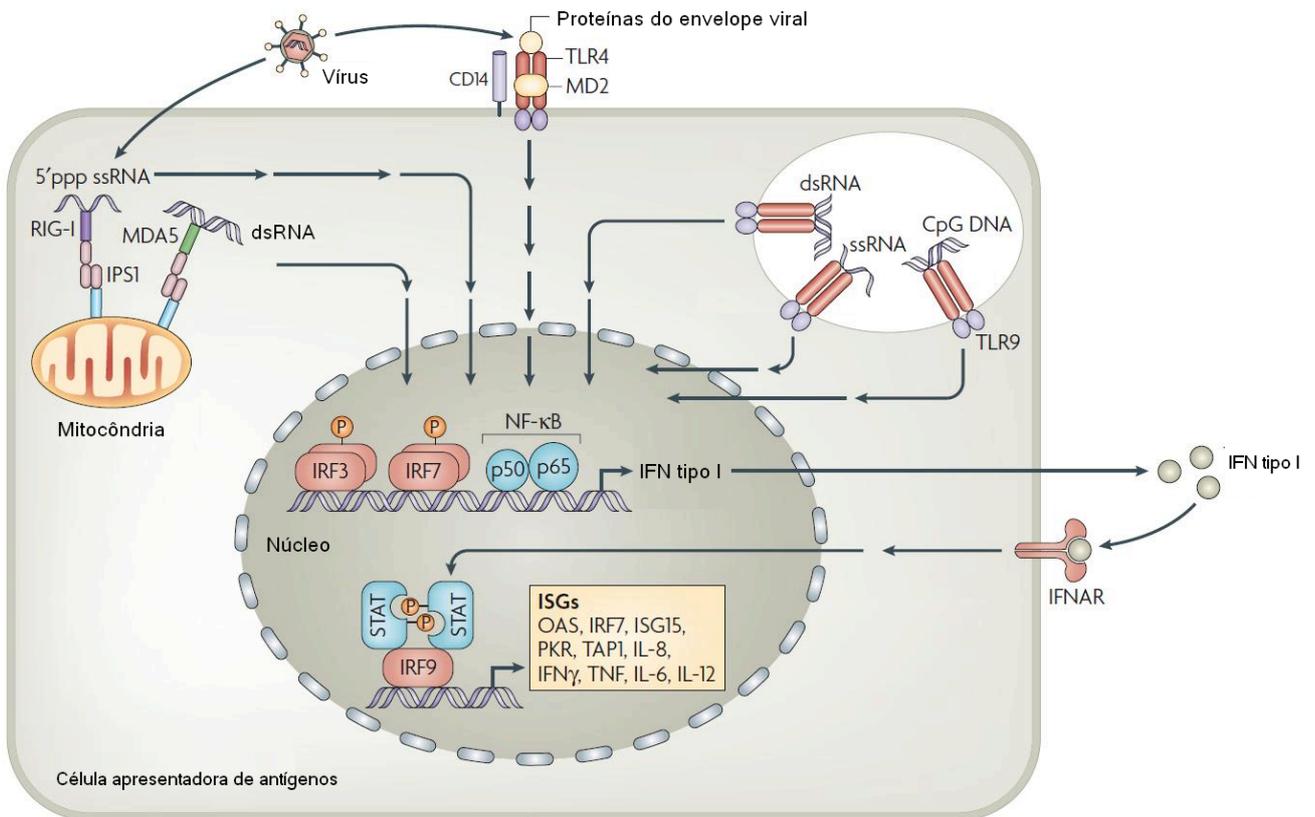


Figura 7 – Representação esquemática da estimulação da expressão dos ISGs e iniciação da atividade antiviral desencadeada pelos IFNs.

As proteínas virais e ácidos nucléicos (PAMPs) são reconhecidos pelos PRRs celulares (TLRs 3,7,8,9 MDA5 ou RIG1). A interação PRR-PAMP desencadeia uma cascata de sinalização que regulam a transcrição dos ISGs e também de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Fonte: adaptado de KATZE *et al.*, 2008.

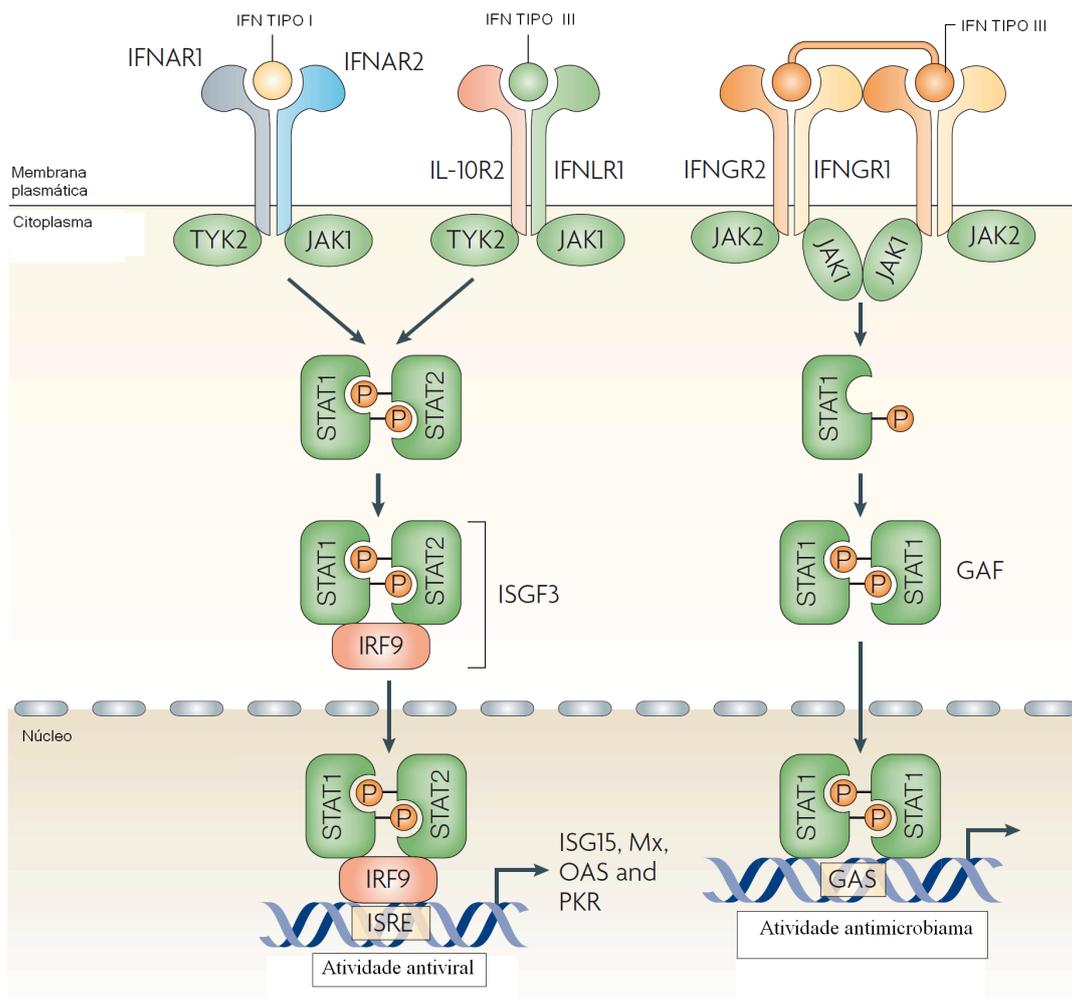


Figura 8 – Representação esquemática da via de sinalização dos IFNs através de seus receptores celulares.

A ação dos interferons é mediada através de seus receptores celulares que ativam fatores da transcrição que se deslocam para o núcleo para induzir os ISGs através do promotor ISREs (elementos responsivos estimulados por IFNs) para os IFNs tipo I e III ou GAS para o IFN tipo II. Fonte: adaptado de SADLER *et al.*, 2008.

Os mais bem caracterizados fatores antivirais induzidos pelos IFNs até o momento são a proteína quinase R (PKR), o sistema 2'-5' oligoadenilato sintetase/RNase L e as proteínas Mx. Estes interferem com a transcrição, a tradução e a replicação do genoma viral (WEBER *et al.*, 2002b; LEVY *et al.*, 2003; BONJARDIM, 2005; HALLER *et al.*, 2006). Os genes 2'5'OAS e PKR quando ativados por ligação à RNA de dupla fita, interrompem a síntese

protéica celular, já o gene MxA está envolvido na inibição da entrada do material genético viral no núcleo da célula hospedeira. O gene 6-16 induzido por interferons é também bem caracterizado e, está envolvido com interrupção da síntese protéica e indução de apoptose (SEN, 2001).

Os IFN são divididos em três grupos de acordo com o complexo receptor pelos quais eles sinalizam: o tipo I (chamados IFNs alfa, beta, delta, épsilon, kappa, ômega e tau), o tipo II (IFN gama) e o tipo III descobertos recentemente (chamados IFNs lambda 1, lambda 2 e lambda 3 ou interleucinas 29, 28a e 28b respectivamente (ANK *et al*, 2006; ALMEIDA *et al*, 2008; BONJARDIM, 2008; SADLER, 2008).

1.4.1 – Interferons do tipo I, II e III

Os interferons do tipo I são divididos em sete subtipos em mamíferos e, cada ordem contém pelo menos um IFN- α e um IFN- β . Por definição os membros do tipo I de IFNs exibem uma atividade antiviral e, se ligam ao mesmo receptor celular (IFNABR) composto de duas subunidades (IFNAR1/2), ativando as mesmas vias de sinalização, que levam a ativação da transcrição de um conjunto de genes controlado pelo complexo transcricional ISGF3 (ALMEIDA *et al*, 2008; SADLER *et al*, 2008; MORDSTEIN *et al*, 2008). Este receptor está presente em quase todos os tipos celulares, sendo pouco abundantes por célula, porém mesmo em baixas quantidades, as células são capazes de responder de forma robusta aos IFNs, sugerindo que podem estar agrupados em áreas específicas da membrana celular (KIM *et al*, 1997). Os genes que codificam os IFNs do tipo I não possuem introns e estão localizados no cromossomo nove humano (VILCEK, 2003).

Os IFN- α e IFN- β são produzidos em resposta às infecções virais por leucócitos e maioria dos tipos celulares, bem como fibroblastos respectivamente, sendo as principais citocinas do sistema imune inato e, sua indução controlada a níveis transcricionais. (GOODBOURN *et al.*, 2000; TANIGUCHI, 2001; VILCEK, 2003). A atividade antiviral dos IFNs do tipo I

ocorre através da ativação dos ISGs e modulação do sistema imune inato (FIGURA 8). Estes possuem ainda funções antiproliferativas (SEN, 2001).

Os IFNs do tipo I combatem os vírus diretamente por inibirem sua multiplicação nas células e, indiretamente por estimular as respostas imunes inatas e adaptativas. A atividade antiviral é exercida por diferentes mecanismos como bloqueio da penetração da partícula viral na célula hospedeira, controle da transcrição viral, clivagem de RNAs e prevenção da tradução dos RNAs produzidos (ANK, 2006).

O tipo II de IFN compreende um único membro (IFN- γ), que se liga ao receptor IFNGR para exercer sua atividade imunomodulatória (ALMEIDA *et al*, 2008; SADLER *et al*, 2008). Este é produzido principalmente por linfócitos T e células “Natural Killer” (NK) após sua ativação por antígenos ou agentes mitogênicos como a fitohemaglutinina e a concanavalina-A e é essencial para modular a resposta imune adaptativa frente a um patógeno (GOODBOURN *et al.*, 2000; VILCEK, 2003). Este não é induzido diretamente em resposta a uma infecção viral, porém, em semelhança aos IFNs do tipo I, também possui atividade antiviral e antiproliferativa (SEN, 2001). O gene que codifica esta citocina está localizado no cromossomo doze humano (VILCEK, 2003).

Os IFNs do tipo I e II e todas as citocinas conhecidas que utilizam os receptores de citocina da classe II sinalizam através dos transdutores de sinais (Jak- tirosinas quinases) e ativadores da transcrição via (Jack-STAT) (FIGURA 8) (VILCEK, 2003).

Os IFNs do tipo III foram descobertos recentemente e são geneticamente e estruturalmente relacionados aos membros da família IL-10 de citocinas, mas com funções similares às dos IFNs do tipo I (SOMMEREYNS *et al*, 2008). Estes são representados por três genes com introns, no cromossomo 19 humano e tal como os IFNs do tipo I, também expressos pelas células mononucleares periféricas do sangue e células dendríticas depois de uma infecção por vírus ou presença de RNA dupla-fita (MEAGER *et al*, 2005;

ALMEIDA *et al*, 2008). Pouco é conhecido desta nova classe de IFNs que têm sido propostos por serem ancestrais dos IFNs do tipo I (SADLER, 2008).

Estes exibem atividade antiviral, porém são estruturalmente e geneticamente distintos dos IFNs do tipo I, se ligando a um complexo receptor que é composto por uma única subunidade IL-28R α (família de receptores de citocinas da classe II) e outra subunidade IL-10R β . Assim, os IFNs do tipo I e III são idênticos em termos de mecanismos de indução, transdução de sinal e atividades biológicas (MEAGER *et al*, 2005;UZÉ *et al*, 2007; ALMEIDA *et al*, 2008).

O receptor celular para os IFNs do tipo I (IFNAR1/2) está presente na maioria, se não todas, as células nucleadas, enquanto a expressão da subunidade IL-28R α é restrita a determinados tipos celulares. Conseqüentemente, a proteção antiviral pelos IFNs do tipo I é observada na maioria dos tipos celulares, enquanto a proteção mediada pelos IFNs- λ é restrita a células que expressam o complexo IL-28R funcional (MORDSTEIN, 2008). Portanto, mesmo as atividades biológicas destes dois grupos de IFN sendo redundantes estas, são geralmente menos intensa e mais restrita (MEAGER *et al*, 2005;UZÉ *et al*, 2007; ALMEIDA *et al*, 2008).

A expressão dos IFNs do tipo III mostrou ser dependente dos mesmos estímulos (infecção viral e TLRs) e vias de transdução de sinal como aquelas para os IFNs do tipo I, apesar dos receptores celulares serem diferentes. As respostas desencadeadas por eles também são similares, levando à ativação de STAT-1 e STAT-2 resultando na transcrição dos conhecidos ISGs (FIGURA 8) (VILCEK, 2003; SOMMEREYNS *et al*, 2008; MORDSTEIN, 2008).

Várias classes de vírus com genomas tanto DNA quanto RNA, são capazes de induzir a expressão de IFN- λ *in vitro*. Além disso, IFN- λ recombinante exibe potente atividade antiviral contra HSV-2 *in vivo*, estimulando também a expressão de IFN- γ durante o curso da infecção (ANK, 2006).

1.4.2 – Interferons e a família *Bunyaviridae*

Experimentos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o IFN- α é capaz de inibir a replicação de muitos vírus, como por exemplo, o vírus da dengue, vaccinia, ebola, dentre outros. Os IFNs têm sido utilizados também para o tratamento de infecções crônicas causadas pelos vírus da hepatite B e C.

LIVONESI *et al*, 2007 demonstrou que, IFN- α foi capaz de apresentar atividade antiviral *in vitro* contra diversos orthobuniavírus como Oropouche, Caraparu, Guama, Guaroa e Tacaiuma. Adicionalmente, esta autora também demonstrou a atividade antiviral *in vivo* do IFN- α contra o vírus Oropouche e Guaroa quando usado para tratamento profilático sugerindo portanto, o potencial terapêutico dos IFNs na prevenção de doenças causadas por membros da família *Bunyaviridae*.

A atividade contra os bunyavirus tem também sido investigada para as proteínas Mx que são GTPases e fazem parte da ativação do estado antiviral induzido pelos IFN- α/β . A multiplicação de diversos membros dessa família, incluindo LAC (vírus La Crosse), RVF (vírus Rift Valley) e HTN (Hantavírus) é fortemente inibida se a proteína humana MxA é produzida pela célula. Destacando desse modo, o quanto os IFNs são importantes para o controle da infecção viral (TANYA *et al.*, 2001; WEBER *et al*, 2002a).

Dados produzidos por pesquisadores do Laboratório de Vírus ICB desde a década de setenta sobre esta família viral, apontam para a importância do sistema interferon para as defesas do hospedeiro e conseqüente estimulação das respostas imunes inatas e adaptativas. Os diversos *Orthobunyavirus* do Grupo C, ainda que estreitamente relacionados entre si, apresentam grande variabilidade na produção e sensibilidade aos interferons, sendo o vírus Oriboca o melhor indutor de IFNs e, o vírus Apeu o mais sensível à ação do interferon em células de membranas amnióticas humanas (MEZÊNCIO *et al.*, 1978; PETRILLO-PEIXOTO, *et al.*, 1980). Recentemente ALMEIDA *et al* 2008

demonstrou a atividade antiviral dos IFNs do tipo I e III ao proteger a célula VERO contra o vírus APEU.

Até o momento, não existem vacinas nem tratamentos para essas arboviroses de grande potencial emergente e o entendimento das respostas antivirais são importantes para o estudo das defesas do hospedeiro contra os agentes virais.

II – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Durante os últimos anos temos assistido a uma alarmante e crescente emergência de doenças virais, e em muitos casos os agentes causadores de tais moléstias não são prontamente reconhecidos, o que dificulta o tratamento dos indivíduos afetados bem como as estratégias de controle epidemiológico. Grande parte dessas doenças virais é causada pelo arbovírus, que podem causar doenças de caráter epidêmico em humanos. Desde o século vinte, poucas regiões do mundo têm escapado dessas epidemias relacionadas aos arbovírus.

O Brasil, como um grande país tropical recoberto por florestas e outros ecossistemas naturais, apresenta condições ideais para a ocorrência de diversas arboviroses, que são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos. Desde a década de cinquenta do século passado, mais de 187 arbovírus diferentes foram isolados na região Amazônica, que possui uma grande diversidade de artrópodes e vertebrados. Deste total, trinta e dois são conhecidos por serem patogênicos ao homem, podendo causar febre, exantema, doença hemorrágica e encefalites. Ainda, uma outra porcentagem é considerada como um importante problema de saúde pública, podendo causar doenças severas em humanos, causando a morte. Epidemias têm sido relatadas nos estados do Pará, Rondônia, Roraima e Amazonas.

O risco da emergência de novas arboviroses no Brasil está diretamente relacionado à existência de grandes centros urbanos, infestados de mosquitos como o *Culex* e o *Aedes aegypti*. Além disso, as mudanças ecológicas e sociais produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência dos vetores e criar novos reservatórios para os arbovírus. Vale destacar também, o tráfego de novos agentes via a migração de pessoas infectadas como um importante mecanismo de dispersão viral.

Os arbovírus pertencentes a família *Bunyaviridae* são os únicos cujo espectro de hospedeiros inclui invertebrados, vertebrados e plantas e com todas essas mudanças que vêm ocorrendo, podemos esperar que os membros desta família se tornem importantes agentes infecciosos emergentes e re-

emergentes. Nesse contexto podemos destacar os *Orthobunyavirus* do grupo C.

Já foi demonstrado que, os vírus do grupo C não estão limitados somente à região norte do Brasil onde foram inicialmente isolados, pois o vírus Caraparu já foi também isolado no estado de São Paulo. Certamente, a distribuição subestimada dos *Orthobunyavirus* do grupo C decorre do simples fato que investigações epidemiológicas para estes vírus concentram-se apenas nas imediações de onde foram inicialmente isolados. Além disso, existem dificuldades nas investigações, devido à interpretação dos resultados dos testes sorológicos, já que reações cruzadas entre os vírus são comuns.

Assim, este trabalho tem como objetivo dar prosseguimento aos demais estudos envolvendo os *Orthobunyavirus* do grupo C, que vêm sendo realizados pelo Laboratório de Vírus. Para tanto, o vírus aqui estudado será o Oriboca (BeAn17).

Os interferons apresentam além de suas propriedades antivirais, um importante papel na regulação do crescimento celular e também essas citocinas atuam como imunomodulatórias das respostas imunes do hospedeiro. Eles são, portanto, um elo entre as respostas imunes inatas e adaptativas.

A atividade antiviral dos IFNs tem sido largamente estudada, como um dos passos para o entendimento dos mecanismos de defesa naturais do hospedeiro, bem como para evidenciar marcadores específicos virais que possam ser alvos para o bloqueio da infecção na célula. A importância desses estudos cresce, na medida em que o risco do aparecimento dessas doenças virais emergentes torna-se cada vez mais eminente.

Alguns IFNs do tipo I são utilizados para o tratamento de algumas doenças virais como a hepatite B e C, já os IFNs do tipo III foram descritos recentemente e, também apresentam atividade antiviral. Suas atividades biológicas são redundantes com as atividades biológicas dos IFNs do tipo III porém, mais estudos são necessários para melhor caracterizar essas ações

para outras famílias virais e seus membros. Os receptores dessas duas classes de IFNs são diferentes, apesar de compartilharem a mesma via de sinalização intracelular para a expressão dos diversos ISGs.

Adicionalmente o receptor para os IFNs do tipo III são restritos a poucos tipos celulares, ao contrário do receptor dos IFNs do tipo I que, são expressos na maioria das células nucleadas. Assim provavelmente, os efeitos colaterais resultantes de um tratamento com essa nova classe de citocinas poderá ser mais brando ou talvez mais específico. Assim a proteção antiviral pelos IFNs do tipo I são observadas na maioria dos tipos celulares, enquanto a proteção antiviral mediada pelos IFNs do tipo III é restrita a células que expressam o complexo receptor funcional II-28R. Por conseguinte o espectro de tipos celulares que respondem ao IFN lambda é ainda pobremente entendido.

O estudo da atividade antiviral dos interferons contra um membro da família *Bunyaviridae*, e de algumas proteínas relacionadas ao estado antiviral pela infecção pelo ORIV, constitui um importante instrumento na busca da compreensão dos eventos que envolvem a relação entre os vírus e as células hospedeiras. A elucidação de tais processos é de vital importância não apenas no campo da Virologia Básica, sendo ainda um ponto de partida para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas e para o desenvolvimento de novas drogas antivirais.

Tais vírus foram em um primeiro instante, submetidos aos ensaios de clonagem de placa, a fim de se obter clones de vírus isolados, que foram então submetidos a reações sorológicas clássicas. Em seguida o objetivo foi avaliar a atividade antiviral dos IFNs do tipo I e III contra a multiplicação do ORIV bem como a capacidade do mesmo em induzir a produzir IFN. Uma outra abordagem foi determinar a participação das proteínas antivirais (ISGs) através da quantificação dos seus mRNAs após infecção pelo ORIV.

O estudo deste *Orthobunyavirus* do grupo C (ORIV) bem como a avaliação de sua sensibilidade aos IFNs do tipo I e tipo III, possibilitou um maior

entendimento acerca de aspectos importantes da biologia desse arbovírus, sobretudo alguns aspectos sorológicos e de sua multiplicação *in vitro*.

III – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Caracterizar através de algumas abordagens biológicas o vírus Oriboca e estudar a atividade antiviral dos IFNs do tipo I e III contra esse arbovírus do grupo C.

3.2 – Objetivos específicos

3.2.1 – Caracterização *in vitro*

- ✓ Clonar a amostra do ORIV e avaliar as reações sorológicas cruzadas entre os clones virais.
- ✓ Analisar o curso da infecção do ORIV em células VERO e avaliar o efeito citopático (ECP);
- ✓ Caracterizar a curva de multiplicação do vírus;
- ✓ Avaliar a indução da produção de IFN após infecção pelo ORIV em células L929;

3.2.2 – Atividade antiviral dos IFNs contra o ORIV

- ✓ Produzir o IFN lambda 1 recombinante;
- ✓ Verificar a atividade antiviral dos IFNs alfa, beta e lambda 1 comparando-as;
- ✓ Determinar se um pré-tratamento com IFN do tipo III influencia na resposta a um segundo tratamento com IFN α 2A;
- ✓ Avaliar a indução dos genes ativados por IFN (ISG) 2'5' OAS, PKR e 6-16, após infecção pelo ORIV.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Células

4.1.1 - Células 293T

As células 293T são uma linhagem de células epiteliais renais humanas e foram multiplicadas em meio DMEM, com alta concentração de glicose suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) contendo gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica(100U/mL) e fungizona(2,0 µg/mL) em ambiente com 5% CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para a produção do IFN lambda 1.

4.1.2 - Células VERO

As células de linhagem contínua VERO, derivadas de epitélio de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), foram adquiridas originalmente da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA, na passagem número 126 e, em seguida, cultivadas no Laboratório de Vírus da UFMG por um número desconhecido de passagens. Estas células foram utilizadas para multiplicação de vírus, titulações, clonagem da amostra viral, além dos experimentos de soroneutralização, curva de multiplicação e atividade antiviral dos IFNs do tipo I e III.

4.1.3 - Células L929

As células murinas L929 foram obtidas do Roche Institute of Molecular Biology, New Jersey, USA, e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Sidney Pestka. Estas células foram utilizadas nos ensaios de indução da produção de interferon após a infecção com o ORIV e em ensaios da medida da atividade antiviral deste interferon.

4.1.4 - A549

As células A549 são células derivadas de carcinoma de pulmão humano. Apesar de serem células tumorais, elas respondem ao tratamento com os IFN, tendo sido

utilizadas nos experimentos de cinética indução dos ISG 2'5'OAS, PKR e 6-16 após infecção com o ORIV. As células A549 são células derivadas de carcinoma de pulmão humano. Estas células respondem ao tratamento com os IFN, portanto, foram utilizadas nos experimentos de cinética indução dos ISG 2'5'OAS, PKR e 6-16 após infecção com o ORIV.

4.1.4 – HepG2

As células HepG2 são células derivadas de hepatocarcinoma humano e foram obtidas da ATCC (catálogo de número HB-8065). Estas células foram utilizadas para os experimentos de atividade antiviral.

4.1.5 - Meio de Cultura e subcultivos

As células VERO, L929 e HepG2, foram cultivadas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, Brasil), gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (100 U/mL) e fungizona(2,0 µg/mL). As células foram mantidas em garrafas apropriadas e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Os subcultivos de todas as linhagens acima citadas, foram realizados em intervalos de 2-3 dias, utilizando-se solução salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 1,5 mM; Na₂HPO₄ 40 mM; KH₂PO₄ 20 mM; pH 7,2) e solução de tripsina/EDTA (NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55 mM; NaHCO₃ 69 mM; 0,5 g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de fenol).

4.2 - Amostra de Vírus

4.2.1 - Origem

Neste estudo foi utilizada a amostra de *Orthobunyavirus* do grupo C Oriboca (BeAn 17), obtido da American Type Culture Collection (ATCC).

4.2.2 - Produção dos estoques virais

O vírus Oriboca foi multiplicado em garrafas (182cm²) contendo monocamada completa de células VERO. A adsorção foi feita a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0.1, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização constante durante 1 hora. Após essa etapa, meio DMEM com 2% de SFB foi acrescentado para um volume final de 25ml, sendo a garrafa incubada até o efeito citopático ter atingido 70 a 90% da monocamada. O sobrenadante das culturas infectadas com o ORIV, foi clarificado após centrifugação por 5 minutos a 2500rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, em rotor SS34) a 4°C. O sobrenadante clarificado foi aliquoteado em microtubos, contendo 300µl e armazenado a -70°C para posterior titulação e uso.

4.3 - Titulação de vírus

4.3.1 - Titulação por UFP

Em placa de seis câmaras, foram implantados 0,7 milhões de células Vero/câmara. Quando as células apresentaram uma confluência de 90%, foram adicionados 500µl de diluições seriadas do vírus em 5 câmaras, deixando uma como controle negativo. Após 1 hora de adsorção, o meio foi removido e foram acrescentados, a cada câmara, 2,0ml de DMEM semi-sólido acrescido de carboximetilcelulose (CMC) e suplementado com 2% de SFB, seguindo nova incubação a 37°C. Após 3-5 dias quando as placas de lise já estavam visíveis a olho nu, o meio foi desprezado e as células fixadas em solução 10% de formol por 30 minutos. Em seguida, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta (1% do corante em 20% de solução alcoólica), por 15 minutos. O título foi expresso em unidades formadoras de placas (UFP/ml), calculada pelo número de placas (entre 30 e 300 placas) multiplicado pelo inverso das diluições. Os resultados foram apresentados pela média de pelo menos 3 titulações.

4.4 - Clonagem da Amostra de Vírus

Monocamadas confluentes de células VERO, em placas de 86 mm de diâmetro (Corning®, USA), foram infectadas com 500 µL de várias diluições, sendo que na diluição 5×10^{-6} de uma das preparações do vírus Oriboca, foram obtidas placas isoladas. A adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com homogeneização de 10 em 10 minutos até 1 hora. Após a adsorção, as células foram lavadas com PBS 1X e foi acrescentada uma mistura contendo meio 199 2X, 2% de SFB, antibióticos e solução de agarose a 2%. As placas foram, então, novamente incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ até o surgimento de áreas de lise, contendo os clones virais. Estes, por sua vez, foram coletados com o auxílio de ponteiras e transferidos para microtubos contendo 100 µL de DMEM sem SFB. Alguns clones virais foram escolhidos aleatoriamente e, utilizados para uma primeira passagem em células VERO em microplacas de 24 cavidades. O sobrenadante após infecção foi coletado e, uma alíquota armazenada a -70°C sendo a outra usada para uma segunda passagem em células VERO, em garrafas de 25 cm² (segunda passagem). O vírus obtido da segunda passagem, também foi clarificado do sobrenadante após centrifugação a 2.500 rpm por 5 minutos, em centrífuga refrigerada Sorvall (RT6000B, em rotor HI000B) a 4°C. Após clarificação, os vírus clonados foram distribuídos (500 µL) em tubos Eppendorf e, armazenados a -70°C. A titulação dos clones virais foi feita conforme já descrito em titulação de vírus.

4.5 - Anticorpos

Anticorpo anti-arbovírus do grupo C-I obtido a partir de fluido ascítico murino foi adquirido do National Institutes of Health (NIH Research Reagente, Nº catálogo G201-701-567, 1966).

Anticorpo policlonal anti-APEUV foi previamente produzido no Laboratório de Vírus (1982) através da imunização de coelhos, concentrado por sulfato de amônio e purificado em gradiente de sacarose. Após imunização, o sangue

dos animais foi coletado e devidamente processado para obtenção do soro, sendo as amostras aliqüotadas, rotuladas e armazenadas a -70°C .

4.3.1 - Ensaio de soroneutralização

Antes de serem utilizadas em ensaio de soroneutralização, as amostras de soro, foram incubadas em banho-Maria a 56°C por 30 min, para inativar o sistema do complemento. A titulação de Ac foi feita diluindo-se o soro na razão de 2, em 250 μl de DMEM com 1% de SFB, em placas de 6 câmaras, nas seguintes diluições: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 e 1:25600. Foram acrescentados a cada diluição, 500 μl da diluição do ORIV estoque, de forma que o ECP pudesse ser visualizado, na cultura de tecido, em aproximadamente 48h. A diluição do soro ocorrida pela adição do vírus (250 μl) foi levada em consideração para efeitos do cálculo do título.

Em seguida as placas contendo a mistura (soro+vírus) foram incubadas a 37°C por 1h, para permitir a interação vírus-anticorpo, quando foi então adicionada às placas de 6 câmaras contendo uma monocamada confluyente de células VERO. Em cada microplaca foram feitos controle de células onde as câmaras receberam 500 μl de DMEM 1% de SFB, enquanto que, as câmaras correspondentes ao controle de vírus receberam 250 μl do vírus sem Ac e 250 μl de DMEM 1% de SFB. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 , a 37°C e foram observadas diariamente até o aparecimento do ECP. As células foram coradas com 48h de após infecção, quando o controle de vírus apresentava um ECP de 75-100%. O título de anticorpos foi então calculado como o inverso da diluição onde houve redução de 50% do ECP.

4.6 - Ensaio de produção de IFN em células L929

As células L929 foram implantadas em placa de 24 câmaras (250 mil células/câmara), em DMEM 5% de SFB, e incubadas a 37°C em estufa de CO_2

por 24h. Então, o sobrenadante das células foi descartado e o vírus Oríboca, adicionado em uma m.o.i. de 1, 10 ou 25. A mistura vírus com célula foi mantida por 1h em estufa de CO₂ a 37°C para a adsorção viral. Após a adsorção, foi acrescentado a cada cavidade 1ml de DMEM com 1% de SFB. Alíquotas de 500 µl de cada sobrenadante foram então coletadas nos tempos 3h, 6h, 12h, 24h e 48h e 72h, inativadas 3 minutos sob luz UV e o IFN presente no sobrenadante foi quantificado pela medida da atividade antiviral em células L929, como descrito por FERREIRA e colaboradores (1977).

4.7 - Atividade antiviral (FERREIRA *et al*,1977)

A titulação das amostras do sobrenadante de células L929 infectadas com o vírus Oríboca foi feita em placas de microtécnica, onde a presença dos IFNs nos sobrenadantes obtidos foi detectada pela inibição da infecção de células pelo vírus da encefalomiocardite murina (EMCV). A atividade antiviral do IFN presente nos sobrenadantes de células L929 foi feita em células L929, visto ser o IFN espécie-específico.

Na medida da atividade antiviral, foi utilizado um IFN de referência de concentração conhecida como controle, IFN- α 2 α 1 recombinante, que, apesar de ser um IFN humano, possui atividade em células murinas. O vírus EMC foi utilizado como vírus desafio.

As amostras dos sobrenadantes foram diluídas em DMEM com 1% de SFB na razão de 2 de 1:10 até 1:20480. Então, 100µL foram aplicados nas cavidades de uma placa de microtécnica contendo monocamada completa de L929. O IFN padrão foi diluído em DMEM com 1% de SFB na razão de 2 de 1:20 até 1:40960. Uma coluna foi utilizada como controle de células L929. Após o tratamento por 18 horas das células com os sobrenadantes ou com o IFN padronizado no laboratório (IFN α 1A gentilmente cedido pelo laboratório Bergamo), foi adicionado em cada cavidade 100µL do vírus EMC (8,5 x10⁷ UFP/mL) diluído 1/8000. Uma coluna também foi reservada para o controle de vírus (células + DMEM 1% de SFB + vírus EMC). Ao adicionar 100µL das

diluições dos vírus às placas, as amostras dos sobrenadantes, assim como os IFNs controle, passaram a uma nova diluição na razão de 2. O título da amostra de IFN foi determinado como a recíproca da maior diluição do interferon, que inibia 50% da multiplicação do vírus.

4.8 – Interferons

Os IFNs alfa2A e beta recombinantes foram obtidos comercialmente (Bergamo e Rentschier Arzneimittel GmbH & Co, respectivamente. O IFN lambda 1 recombinante foi produzido em células 293T utilizando o plasmídeo pSPXIIneo contendo a sequência deste IFN clonada. Tal plasmídeo clonado em bactérias *Escherichia coli* DH5 α competentes, foi gentilmente cedido pelo Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida (St Mary Campus (Imperial College London). Estes IFNs foram utilizados nos experimentos de atividade antiviral.

4.8.1 – Obtenção do plasmídeo pSPXIIneo em grande escala para a produção do IFN lambda 1 recombinantes (Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

Bactérias *Escherichia coli* DH5 α contendo tal seqüência deste IFN clonada, foram crescidas em meio (LB) 1X (bacto triptona 1% p/v; extrato de levedura 0,5% p/v; NaCl 171 mM) contendo ampicilina (50 μ g/mL) para a obtenção do plasmídeo em larga escala através do emprego do Kit Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Este se baseia na purificação através de um procedimento modificado de lise alcalina, seguida pela ligação do plasmídeo à resina de troca aniônica da Qiagen sob condições apropriadas. RNA, proteínas e impurezas são removidas e o plasmídeo eluído em um tampão com alta concentração de sal e em seguida precipitado e concentrado com isopropanol.

4.8.2 - Produção de IFN lambda 1

Células 293T multiplicadas em garrafas de 75 cm² com 50% de confluência foram utilizadas para a transfecção. Quinze µg do plasmídeo pSPXIIneo foi misturado com 600 µL de OPTMEM em um microtubo. Paralelamente, em outro microtubo foi misturados 50 µL de lipofectamina com 600 µL de OPTMEM. Estes foram incubados à temperatura ambiente por 45 minutos. Após estes tempo o conteúdo dos microtubos foram misturados e, seguida nova incubação por quinze minutos. As células foram então lavadas com DMEM com alta concentração de glicose, sem antibióticos e SFB. O plasmídeo-lipofectamina agora, foi misturado à 8,8 mL de DMEM com alta concentração de glicose sem antibióticos e SFB e adicionados à garrafa contendo a célula 293T. Uma garrafa foi deixada como controle da transfecção. O meio das garrafas foi coletado 24h, 72h e 120h após a transfecção, sendo o meio repostado com igual volume, para posterior titulação do IFN produzido.

4.8.3 - Titulação do IFN lambda 1 recombinante

Os IFNs produzidos em células 293T foram diluídos em meio DMEM contendo 1% de SFB, colocados no primeiro poço de uma placa de 96 câmaras e então diluídos na razão de 2 de 1:5 até 1:10240 ao longo da placa. Os IFNs diluídos foram utilizados para tratar células VERO cultivadas em placas de 96 câmaras com 90% de confluência. Para isso, 100µL foram aplicados em cada cavidade da placa de 96 câmaras. O IFN padrão do laboratório de concentração conhecida, foi diluído em DMEM com 1% de SFB na razão de 2 de 1:2000 até 1:4096000. Uma coluna foi utilizada como controle de células L929 e outra para o controle de vírus. Após o tratamento por 18 horas das células com os sobrenadantes ou com o IFN padrão, foi adicionado em cada cavidade 100µL do vírus EMC ($8,5 \times 10^7$ UFP/mL) diluído 1/15000. Ao adicionar 100µL das diluições dos vírus às placas, as amostras dos sobrenadantes, assim como o IFNs padrão, passaram a uma nova diluição na razão de 2. A infecção foi monitorada por 48 horas e as placas fixadas com formol 3,7% e coradas com cristal violeta 1% para análise do resultado.

4.9 - Avaliação da atividade antiviral dos IFNs

A sensibilidade do ORIV aos IFN- α humano (HuIFN- α 2A), IFN- β e IFN- λ 1, foi observada em células VERO, uma vez que essas não produzem IFN. Para tal, um total de 700 mil células/câmara foi implantada em placa de 6 câmaras, em DMEM 5% de SFB, e incubadas a 37°C em estufa de CO₂. Após a formação da monocamada, foram adicionadas em cada cavidade 0,1, 1, 10, 100, 1000 ou 10000 unidades/ml de IFN, diluídos em DMEM 1% de SFB. As células controle não foram pré-tratadas com IFN e receberão apenas DMEM 1% de SFB. Após 18h do tratamento com os IFNs, o sobrenadante das células foi descartado e o vírus adicionado às cavidades em uma m.o.i. de 1, em um volume de 500 μ l de DMEM sem SFB. As placas permaneceram por 1h em atmosfera de CO₂ a 37°C, sob homogeneização constante, para adsorção viral. Após o período de adsorção, a monocamada de células foi lavada 2 vezes com PBS 1X para retirar todos os vírus que não adsorveram e foi adicionado em cada cavidade 2 mL de DMEM semi-sólido acrescido de carboximetilcelulose (CMC) e suplementado com 2% de SFB, seguindo nova incubação a 37°C. As placas serão então mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, para a titulação dos vírus presentes por contagem das unidades formadoras de placa.

4.10 - Indução dos genes estimulados por IFN (ISG)

4.10.1 - Extração de RNA total celular

Células A549 foram crescidas em placas de 6 câmaras e após 80% de confluência, foram infectadas com o ORIV, em uma m.o.i. de 1. Células não infectadas foram utilizadas como controle. Nos tempos 6, 18 e 24 h.p.i., o RNA total celular foi extraído com o kit RNeasy (Qiagen, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.10.2 – Reação de transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa, 5µl do RNA extraído das culturas de células foram utilizados como molde. As reações foram feitas utilizando-se a enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase-Promega), tampão 5X, dNTPs, oligo dT, DTT nas concentrações indicadas pelo fabricante e água q.s.p para 25 µl. O RNA, oligo dT e água foram incubados a 70°C por 5 min e depois deixados em gelo por 5 min. Os outros componentes da reação foram adicionados e os tubos foram incubados a 42°C por 1h e a 72°C por 15min. O cDNA resultante foi diluído em 50 µl de água e utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real.

4.10.3 – Reação em cadeia da polimerase- PCR em tempo real

A ativação dos ISGs 2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA foi avaliada por PCR em tempo real, após infecção com o ORIV. O gene constitutivo β-actina foi utilizado também em reações para normalizar a quantidade interna de RNA. Foram utilizados os seguintes iniciadores nas reações:

2'5'OAS:

2'5'OAS FWD – 5`AACTGCTTCCGACAATCAAC 3`

2'5'OAS REV – 5`CCTCCTTCTCCCTCCAAAA 3`

6-16:

6-16 FWD – 5`CATGCGGCAGAAGGCGGTAT 3`

6-16 VER – 5`CGACGGCCATGAAGGTCAGG 3`

PKR:

PKR FWD – 5`TCTACGCTTTGGGGCTAA 3`

PKR VER – 5`GCCATCCCGTAGGTCTGT 3`

MxA:

MxA FWD – 5'ATCCTGGGATTTTGGGGCTT3'

MxA VER – 5'CCGCTTGTCGCTGGTGTTCG 3'

 β -actina:

β -actina FWD – 5'TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC C 3'

β -actina VER – 5'CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GG 3'

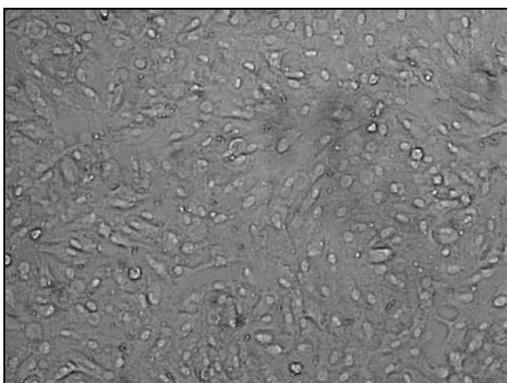
O cDNA obtido com as reações de transcrição reversa foram utilizados como molde nas reações de PCR em tempo real. As reações de PCR em tempo real foram feitas em triplicata utilizando TAQ recombinante, dNTPs, MgCl₂, tampão 10X, iniciadores, SYBR Green e água. O aparelho Lightcycler (Roche) foi utilizado e os valores de Δ Ct foram corrigidos pelo valor do gene constitutivo β -actina. O valor $2^{\Delta Ct}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para construção dos gráficos.

V – RESULTADOS

5.1 - Caracterização do ORIV (BeAn17)

A multiplicação do vírus Oriboca foi efetiva em células Vero, alcançando altos títulos virais (8×10^7 UFP/mL). Assim, a caracterização do ORIV (BeAn 17) foi feita inicialmente observando-se o efeito citopático (ECP) nestas células quando infectadas (FIGURA 9). Este membro dos *Orthobunyavirus* do Grupo C quando inoculados em células VERO, produzem inicialmente lesões localizadas, com grupos de células arredondadas e refringentes. Com o decorrer da infecção, surgem vários desses focos, que vão se confluindo, ocasionando o desarranjo da monocamada, culminando com 100% de morte celular. A curva de multiplicação também foi estabelecida em células VERO (FIGURA 10) utilizando-se uma m.o.i de 1. Observou-se que quantidades significativas de vírus ($5,2 \times 10^6$ UFP/mL) já começam ser detectadas 12 h.p.i, sendo a produção máxima observada 48 h.p.i, com título de vírus que chegam a $1,13 \times 10^9$ UFP/mL. O ECP de 100% foi observado 72 h.p.i, quando o título do vírus começa a diminuir.

A)



B)

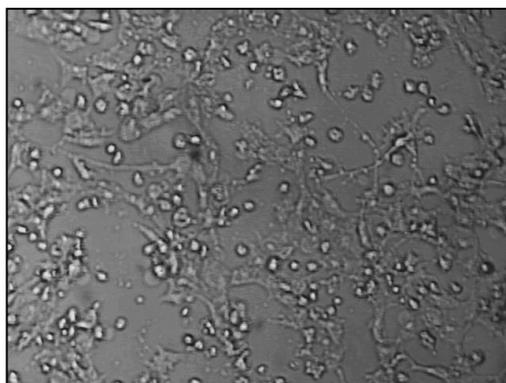


Figura 9 - Características da multiplicação do ORIV em células VERO. Microscopia óptica de células VERO controle (A) e após 48 h de infecção com o ORIV em uma m.o.i. de 1 (B).

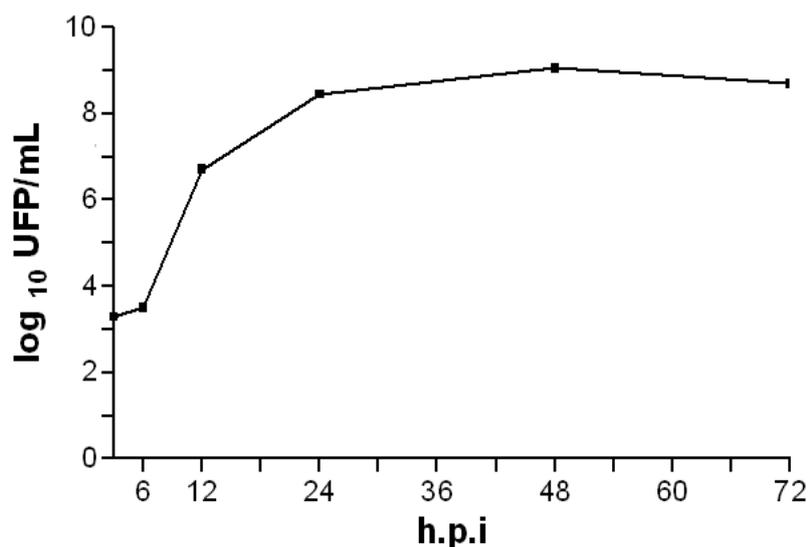


Figura 10 - Curva de multiplicação do ORIV, determinada por titulação de amostras do sobrenadante de células VERO infectadas numa m.o.i. de 1, coletadas em diferentes horas pós infecção.

5.2 – Clonagem do ORIV

A amostra do ORIV foi clonada pelo método de Dulbecco em células VERO, para evitar a presença de uma população mista contendo vírus rearranjados, pois este não é um evento raro de acontecer com os vírus RNA, sobretudo da família *Bunyaviridae*. Então, o primeiro passo foi garantir uma população de vírus homogênea para dar prosseguimento aos experimentos propostos. A partir da clonagem, foram obtidos clones isolados do vírus Oriboca, que posteriormente foram também multiplicados e titulados em células Vero, com títulos em média 10^7 UFP/mL. A FIGURA 11 mostra o resultado da clonagem com a característica das UFP. Foram coletados 7 clones isolados.

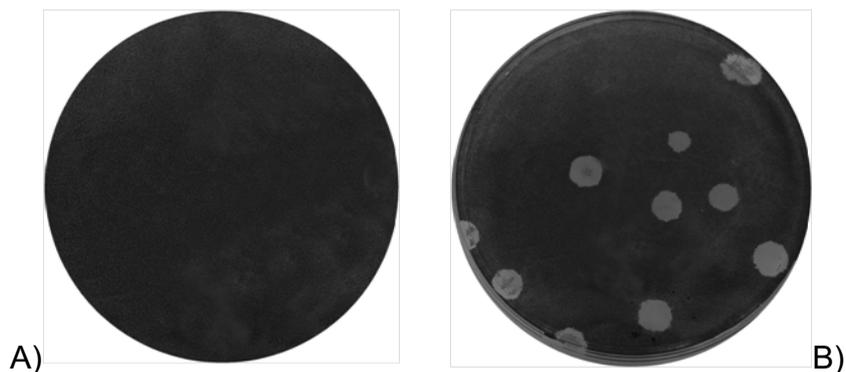


Figura 11 - Clonagem de placa do ORIV em células VERO. Células VERO foram implantadas em placas de 86 mm de diâmetro (Corning®, USA) e posteriormente infectadas com diluição de 5×10^{-6} do ORIV, pois esta foi a diluição estimada para que fosse obtida placas isoladas para facilitar a seleção dos clones. Após a visualização das placas de lise (3 d.p.i.), os clones foram aleatoriamente selecionados, coletados com ponteiras por raspagem e colocados em microtubos contendo 0,1ml de DMEM 5% para posterior multiplicação. A) Controle de células. B) Placa clonagem ORIV.

5.3 – Ensaio de soroneutralização

Para verificar a relação antigênica entre o vírus Oriboca e o vírus Apeu, foi feita reação de neutralização (NT) com soro de coelho contendo anticorpos anti-Apeu, previamente produzido no Lab. de Vírus (ICB-UFMG). A reação de NT foi feita também com 4 clones isolados do vírus Oriboca a fim de se avaliar a homogeneidade da população presente na amostra protótipo. Não houve reatividade cruzada entre o anticorpo anti-Apeu e o vírus Oriboca visto que, não houve proteção das células à infecção, mesmo na menor diluição do soro (1/50). Adicionalmente, também não foi observada reatividade cruzada com as 4 amostras de vírus clonadas (dados não mostrados).

A reação de neutralização (NT) foi feita também, para comparar a reatividade cruzada entre o ORIV e seus clones virais isolados, utilizando-se agora para isso, fluido ascítico murino contendo anticorpos anti-arbo grupo C-I (NIH Research Reagente, Nº catálogo G201-701-567, 1966).

As unidades de anticorpos neutralizantes contidas em 0,5 mL de soro ou fluido ascítico (UN/0,5 mL) foram calculadas como o inverso da diluição em que

houve redução de 50% do ECP. As reações foram feitas em triplicata e os títulos expressos como a média dos resultados.

Todos os quatro clones foram reconhecidos pelos anticorpos presentes do fluido ascítico e sua infecção foi neutralizada, com títulos iguais aos obtidos para amostra original não clonada. O título de anticorpos para o fluido ascítico murino foi 3200 UN/1 mL.

Para continuar os estudos com o ORIV, um clone foi aleatoriamente escolhido (clone 7) para dar continuidade aos experimentos propostos, já que os resultados obtidos até aqui se mostraram homogêneos.

5.4 - Ensaio de produção de IFN em células L929 e atividade antiviral

Para investigar a capacidade do ORIV em induzir IFN *in vitro*, utilizamos células murinas L929, que sabidamente são capazes de produzir tais citocinas. O ensaio da medida da atividade antiviral foi utilizado para quantificar o IFN presente no sobrenadante de células infectadas.

Conforme pode ser verificado na FIGURA 12, o ORIV foi capaz de induzir a síntese de IFN nas células L929. O IFN foi detectado no sobrenadante das células infectadas nas diferentes m.o.i. utilizadas. O IFN foi detectado a partir de 8 h.p.i, não sendo detectado em tempos mais precoces que este. O IFN presente nos sobrenadantes de células infectadas com m.o.i. de 1 foi detectado somente a partir de 24 h.p.i. Um acréscimo considerável nos níveis de IFN foi observado na m.o.i. de 10 e 25, com o pico da produção no tempo de 24 h.p.i., para todas as m.o.i. testadas. O IFN detectado a partir de 8 h.p.i. apresentou o título de 200 UI/ml, com a m.o.i. de 10, e no tempo de 24 h.p.i. com a mesma m.o.i. anterior, houve um aumento do título de 40 vezes (8000 UI/ml). O sobrenadante de células L929 não infectadas foi utilizado como controle, não sendo detectada nenhuma atividade antiviral.

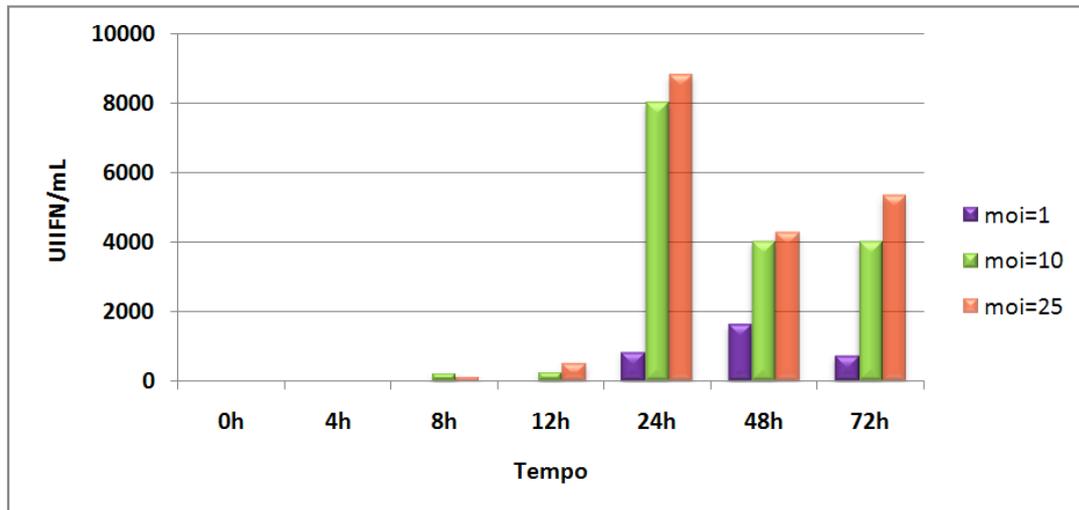


FIGURA 12 - Indução de IFN após infecção pelo ORIV em células L929. Células L929 foram infectadas com o ORIV e, após diferentes tempos, amostras do sobrenadante foram coletadas e a quantidade de IFN determinada pela medida da atividade antiviral. Os resultados foram calculados como a média de três experimentos independentes

5.5 - Obtenção de plasmídeo em grande escala para a produção do IFN lambda 1 recombinante (Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen))

Para se obter o plasmídeo contendo a seqüência do IFN lambda 1 recombinante clonado em bactérias *Escherichia coli* DH5 α , foi utilizado o Kit Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). O DNA obtido, foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoDrop ND-1000) e estocado a -20°C, onde obtivemos 342,9 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$). Este material também foi aplicado em gel de agarose a 1% para se avaliar a qualidade conforme a FIGURA 13.

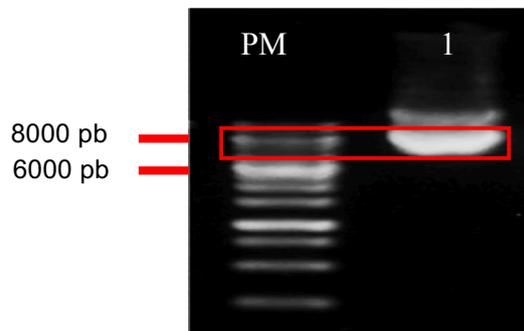


FIGURA 13 - Fotografia do gel de agarose para se avaliar a qualidade do DNA obtido através da extração com o Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e submetido a eletroforese a 100 V. pm- padrão de tamanho molecular 1kb; 1 – plasmídeo pSPXIIneo contendo fragmento do IFN- λ 1 clonado.

5.6 - Produção de IFN lambda 1 recombinante

Para a obtenção de IFN lambda 1 recombinante, células 293T foram utilizadas para a produção dessa citocina em sistema eucarioto. Para isso essas células foram transfectadas transientemente com o plasmídeo pSPXIIneo contendo a seqüência deste IFN clonada. O sobrenadante das células transfectadas foi coletado um, três e cinco dias após a transfecção e concentrado por desidratação com PEG 20000 para posterior titulação em células VERO. Como controle células 293t foram transfectadas com lipofectamina sem DNA e o sobrenadante também coletado. A atividade antiviral dos sobrenadantes coletados foi avaliada em células VERO tratadas com o IFN e desafiadas com o vírus EMC. Foi possível verificar que, o IFN lambda 1 produzido foi capaz de proteger as células VERO no título de 6400 UI/mL. Esta proteção não foi devido a indução de outros IFNs pelo processo de transfecção, já que o sobrenadante de células controle não apresentou atividade antiviral.

5.7 - Avaliação da atividade antiviral de IFNs do tipo I contra o ORIV em células VERO

É sabido que, células VERO são comumente usadas para o estudo de IFNs, pelo fato de responderem bem a estes IFNs e, possuírem uma deleção cromossômica na região que os codifica não sendo assim, capaz de expressar IFNs endógenos (DIAZ *et al*, 1988). Portanto, essas células são capazes de

responder a tratamentos com IFN sem, no entanto os produzirem, mesmo quando estimuladas. Então células VERO foram tratadas com concentrações variadas dos IFN alfa2A e beta recombinantes e infectadas dezoito horas depois com o ORIV numa m.o.i de 1, com o objetivo de se determinar a concentração mais eficaz na indução do estado antiviral. O tempo de dezoito horas de tratamento foi o escolhido, pois dados da literatura, apontam este tempo como o mínimo necessário, para a ativação de um estado antiviral nas células. Aproximadamente 72 após a infecção, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra por titulação. Verificamos que, os dois IFNs testados foram capazes de proteger as células Vero contra ORIV. A atividade antiviral verificada é dose dependente, e o IFN beta o que mais inibiu a multiplicação do ORIV. A partir de 0,1 UI/mL o IFN β já foi capaz de proteger as células, enquanto o IFN α a partir de 10 UI/mL já apresenta uma redução significativa das UFP (60% aproximadamente). Na concentração de 1000 UI/mL e 10000 UI/mL a proteção foi equivalente para todos os IFNs FIGURA 14 e 15. Esses dados são confirmados pela curva de multiplicação do ORIV quando tratado ou não com esses dois IFNs do tipo I (FIGURA 16).

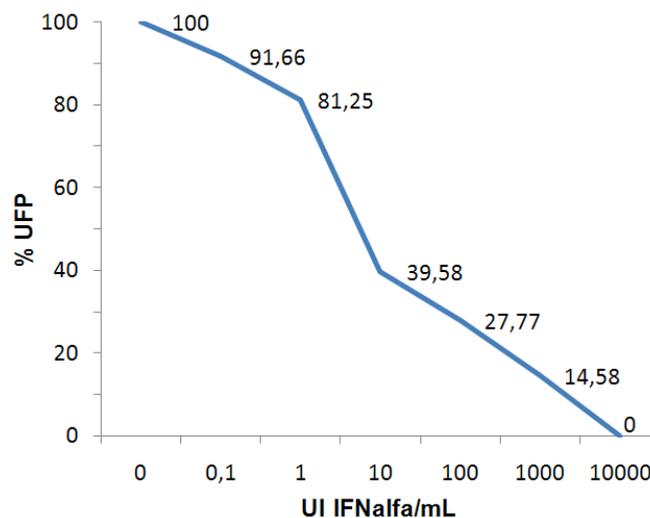


FIGURA 14 - Atividade antiviral do IFN α 2a recombinante contra o ORIV. Diferentes concentrações do IFN α 2A foram usadas para o tratamento de células VERO e, 18 horas depois infectadas com uma m.o.i de 1 com o ORIV. Aproximadamente 72 após a infecção, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra por titulação. No controle de vírus (CV) o vírus Oriboca foi adicionado às células que não foram previamente tratadas com o IFN α comparando-se ao CV. Verificamos que, o IFN α foi capaz de proteger as células Vero contra ORIV, principalmente a partir do tratamento com 10 UI/mL e que a atividade viral é dose dependente.

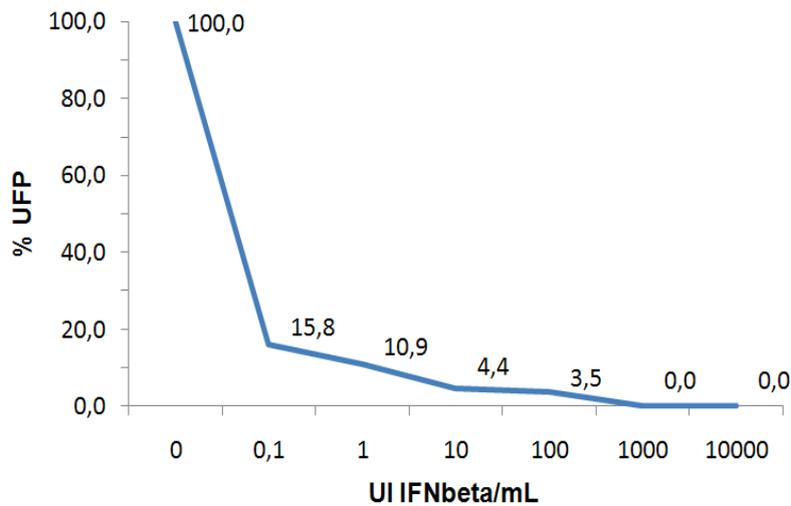


FIGURA 15 - Atividade antiviral do IFN β recombinante contra o ORIV. Diferentes concentrações do IFN β foram usadas para o tratamento de células VERO e, 18 horas depois infectadas com uma m.o.i de 1 com o ORIV. Aproximadamente 72 após a infecção, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra por titulação. No controle de vírus (CV) o vírus Oríboca foi adicionado às células que não foram previamente tratadas com o IFN β comparando-se ao CV. Verificamos que, o IFN β foi capaz de proteger as células Vero contra ORIV mesmo em baixas concentrações. A atividade antiviral verificada é dose dependente.

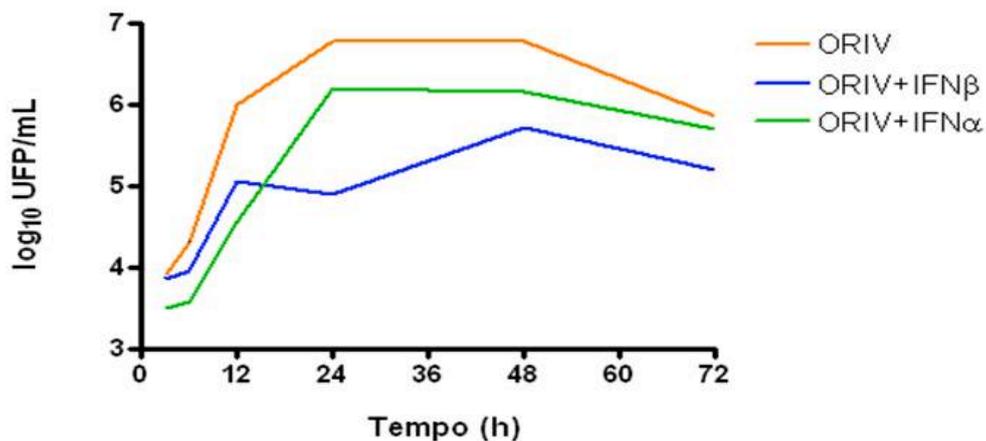


FIGURA 16 – Curva de crescimento do ORIV em células tratadas com IFNs do tipo I. Células VERO foram tratadas com 100 UI/mL de IFN α 2A e IFN β , e dezoito horas depois infectadas com o ORIV numa m.o.i de 1. Após diferentes tempos, o sobrenadante foi coletado e os títulos virais determinados por titulação.

5.8 - Avaliação da atividade antiviral de IFNs do tipo III contra o ORIV em células VERO

Os IFNs do tipo III possuem vias de sinalização redundantes com os IFNs do tipo I e, também são induzidos rapidamente após infecções virais. Mas como se ligam em receptores distintos que, possuem uma estrutura diferente, podem haver diferenças entre sua atividade antiviral e a dos outros IFNs. Os estudos de atividade antiviral dos IFNs do tipo III para a maioria dos membros da família *Bunyaviridae*, permanecem ainda por serem esclarecidos.

Aqui também células VERO foram tratadas com diferentes concentrações do IFN lambda I produzido. O tempo de tratamento escolhido neste caso foi o de 24 horas, pois dados da literatura indicam este tempo como efetivo para se estabelecer um estado antiviral ao se trabalhar com IFNs do tipo III. Aproximadamente 72 após a infecção, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra por titulação. Verificamos que baixas concentrações de IFN lambda 1 protegeram as células da infecção pelo ORIV. Somente com 1000 UI/mL houve uma redução das UFP de 50% em relação às células não tratadas com esta citocina. O sobrenadante de células controle não apresentou atividade antiviral (mock). (FIGURA 17).

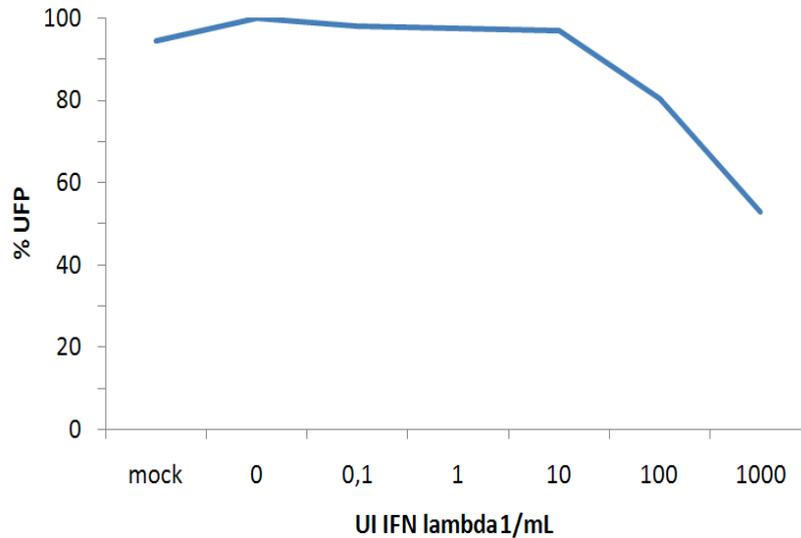


FIGURA 17 - Atividade antiviral do IFN λ 1 contra o ORIV. Diferentes concentrações do IFN λ 1 foram usadas para o tratamento de células VERO e, 24 horas depois infectadas com uma m.o.i de 1 com o ORIV. Aproximadamente 72 após a infecção, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra por titulação. No controle de vírus (CV) o vírus Oríboca foi adicionado às células que não foram previamente tratadas com o IFN λ 1 comparando-se ao CV. Verificamos que, o IFN λ 1 foi capaz de proteger as células Vero contra ORIV mesmo em baixas concentrações. A atividade antiviral verificada é dose dependente.

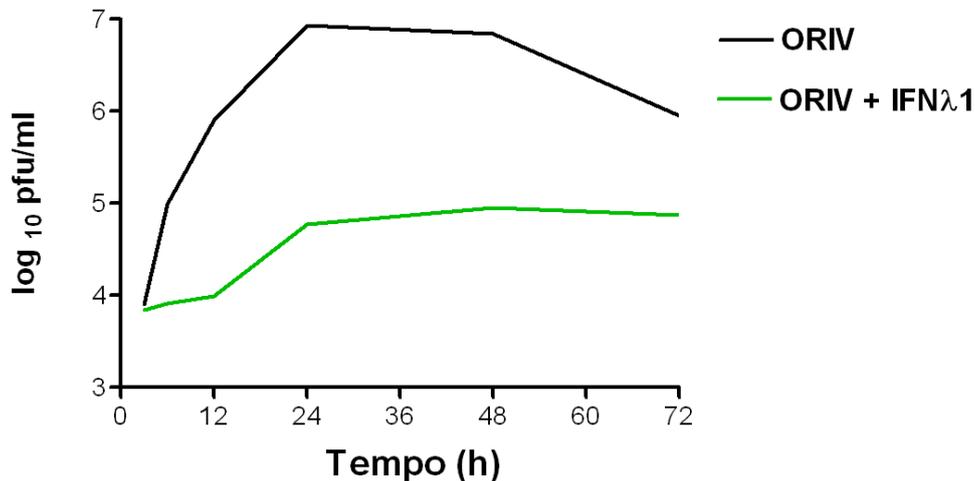


FIGURA 18 - Curva de crescimento do ORIV em células tratadas com IFN λ 1. Células VERO foram tratadas com 1000 UI/mL de IFN λ 1, e 24 horas depois infectadas com o ORIV numa m.o.i de 1. Após diferentes tempos, o sobrenadante foi coletado e os títulos virais determinados por titulação.

5.9 - Co-tratamento de células VERO com IFNs do tipo I e tipo III e relação com a atividade antiviral contra o ORIV

Para avaliar se o uso de IFN do tipo III poderia aumentar os efeitos antivirais dos IFNs do tipo I, células VERO foram crescidas em placas de 96 câmaras por 24 horas e depois tratadas com uma combinação dos tipos I e III em concentrações altas ou baixas. Dezoito horas depois as células foram infectadas com o ORIV em uma m.o.i de 1 e, 24 horas depois as placas foram congeladas em freezer - 70°C. Posteriormente as placas foram descongeladas, para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra por titulação.

Dadas as condições do experimento, o co-tratamento com tipos diferentes ou com o mesmo tipo de IFN não altera a atividade antiviral de cada tipo de IFN, tanto em doses baixas quanto altas (FIGURAS 19 e 20).

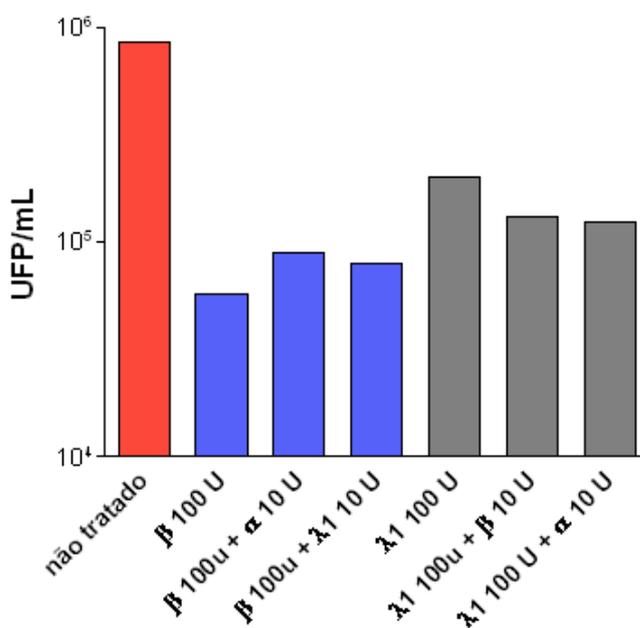


Figura 19 – IFNs do tipo I quando combinados com IFN-λ1 (tipo III) não aumenta a atividade antiviral sobre a multiplicação do ORIV. Células VERO foram tratadas com diferentes combinações de IFNs do tipo I e tipo III e, infectadas 18 horas depois com o ORIV (m.o.i. 1). Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram congeladas e a quantidade de vírus determinada por titulação de cada amostra. Títulos virais de célula tratadas com 100 U/mL de IFN-β ou IFN-λ1 apenas ou misturados com IFNs α/λ1 10 U/mL.

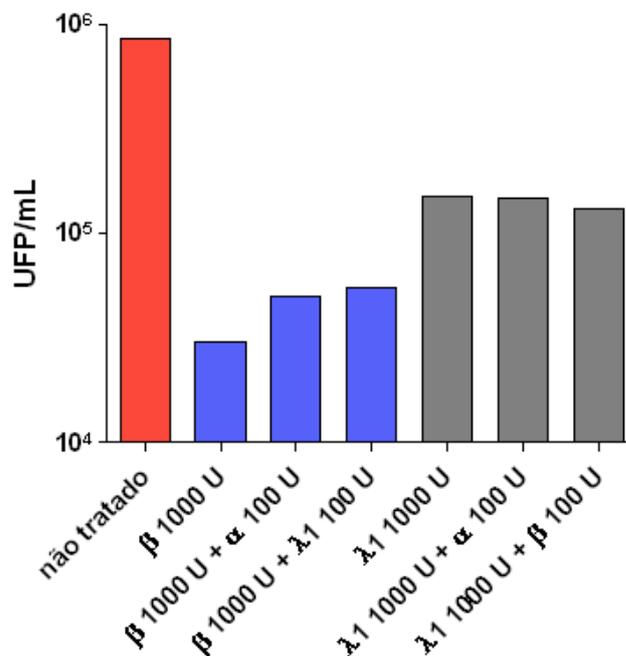


Figura 20 – IFNs do tipo I quando combinados com IFN-λ1 (tipo III) não aumenta a atividade antiviral sobre a multiplicação do ORIV. Células VERO foram tratadas com diferentes combinações de IFNs do tipo I e tipo III e, infectadas 18 horas depois com o ORIV (m.o.i. 1). Vinte e quatro horas após a infecção, as células foram congeladas e a quantidade de vírus determinada por titulação de cada amostra. Títulos virais de célula tratadas com 1000 U/mL de IFN-β ou IFN-λ1 apenas, ou misturados com IFNs α/λ1 100 U/mL.

5.10 - PCR em tempo real

Para melhor caracterizar a atividade dos IFNs, PCRs em tempo real foram feitas para se quantificar os níveis de expressão de quatro genes induzidos por IFNs ligados à atividade antiviral (2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA), em células A549 infectadas pelo ORIV em uma m.o.i de 1, nos tempos 6, 18 e 24 h.p.i., o RNA total celular foi extraído e utilizado como molde em reações de transcrição reversa. O gene da β-actina foi usado como normalizador da quantidade interna de RNA nas reações e o IFN-β foi usado como controle positivo das reações, pois os IFNs podem induzir a expressão de um grande número de ISGs, levando também ao estabelecimento de um estado antiviral.

A expressão dos quatro ISGs (2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA) foi aumentada nestas células após infecção pelo ORIV. O aumento da expressão dos genes 2'5'OAS foi detectado somente no tempo de 24 h.p.i., enquanto que um aumento na expressão dos gene PKR e MxA foi percebido desde 6 h.p.i. Já o gene 6-16 teve sua expressão detectada nos tempos de 18 e 24 h.p.i. Níveis basais de expressão dos genes 6-16 e MxA (FIGURAS 22 e 23) foram observados nas células controle. O RNA das células usadas como controles positivos (células tratadas com IFN- β 10000 UI/mL) e negativos (células não infectadas) foram extraídos no tempo de 24 horas.

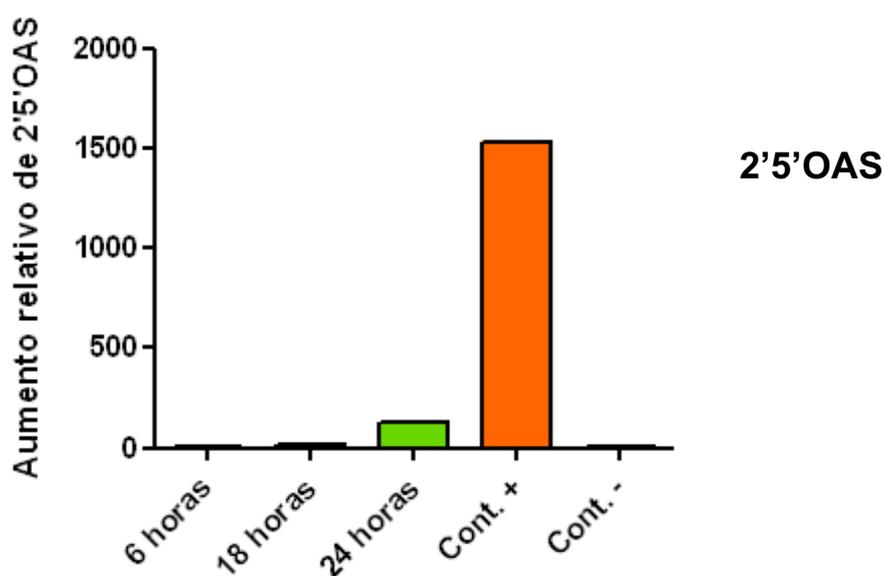


Figura 21 – Níveis de ISG em células A549 após infecção com o ORIV. Células humanas A549 foram infectadas com o ORIV numa m.o.i. de 1. O RNA celular total foi extraído nos tempos 6, 18 e 24 h.p.i. e os níveis de 2'5'OAS foram medidos por PCR em tempo real. Os valores de ΔC_t de cada amostra foram corrigidos pelo valor do gene constitutivo (β -actina). O valor $2^{\Delta C_t}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para construção do gráfico.

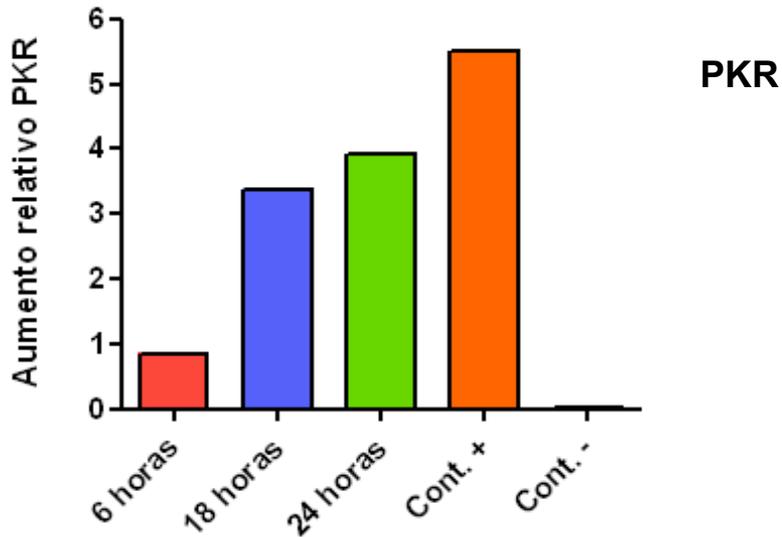


Figura 22 – Níveis de ISG em células A549 após infecção com o ORIV. Células humanas A549 foram infectadas com o ORIV numa m.o.i. de 1. O RNA celular total foi extraído nos tempos 6, 18 e 24 h.p.i. e os níveis de PKR foram medidos por PCR em tempo real. Os valores de ΔCt de cada amostra foram corrigidos pelo valor do gene constitutivo (β -actina). O valor $2^{\Delta Ct}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para construção do gráfico.

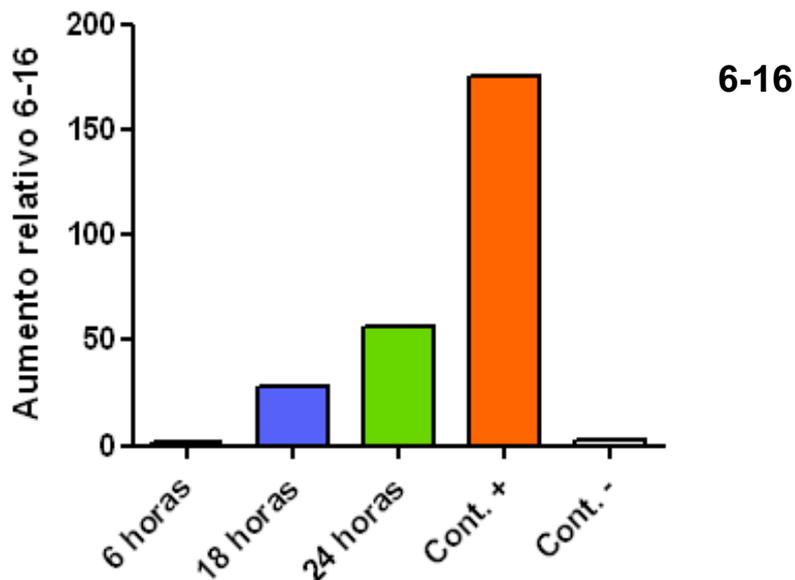


Figura 23 – Níveis de ISG em células A549 após infecção com o ORIV. Células humanas A549 foram infectadas com o ORIV numa m.o.i. de 1. O RNA celular total foi extraído nos tempos 6, 18 e 24 h.p.i. e os níveis de 6-16 foram medidos por PCR em tempo real. Os valores de ΔCt de cada amostra foram corrigidos pelo valor do gene constitutivo (β -actina). O valor $2^{\Delta Ct}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para construção do gráfico.

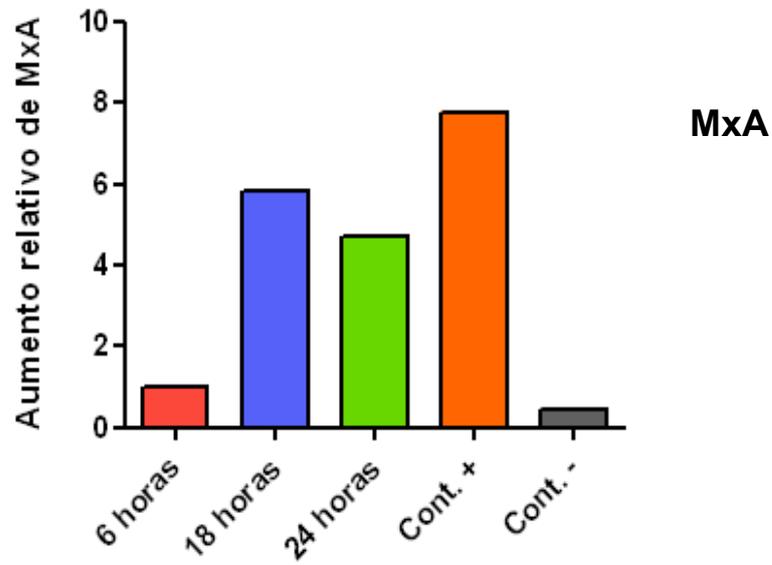


Figura 24 – Níveis de ISG em células A549 após infecção com o ORIV. Células humanas A549 foram infectadas com o ORIV numa m.o.i. de 1. O RNA celular total foi extraído nos tempos 6, 18 e 24 h.p.i. e os níveis de MxA foram medidos por PCR em tempo real. Os valores de ΔCt de cada amostra foram corrigidos pelo valor do gene constitutivo (β -actina). O valor $2^{\Delta Ct}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para construção do gráfico.

VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Para dar início ao presente trabalho, começamos por caracterizar o padrão de crescimento e ECP característico desta amostra de vírus, que seria o nosso objeto de estudo. Verificamos que as células VERO mostraram ser um excelente sistema para a multiplicação do ORIV, pois nessas células nós obtivemos altos títulos virais sendo que, o ECP se caracterizou inicialmente como lesões localizadas, com grupos de células arredondadas e refringentes. A produção viral começa a ser detectada em altos títulos a partir de 12 h.p.i, sendo que a produção máxima é atingida no tempo de 48 h.pi. Células VERO são muito utilizadas para a multiplicação de vírus da família *Bunyaviridae*, e, tais vírus estão portanto, muito bem adaptados a esta linhagem celular. O ECP observado foi muito semelhante aos descritos por Buckley e Shope (1961) para os arbovírus do grupo C quando multiplicados em células HeLa. Fato relevante é que, células VERO não são capazes de produzir interferon, devido a uma deleção cromossômica no gene que expressa tal citocina (PETRILLO-PEIXOTO *et al*, 1980; DIAZ *et al*, 1988) facilitando, desse modo, a multiplicação de vírus.

Para dar seguimento aos objetivos propostos neste trabalho, a clonagem do ORIV foi feita para garantir uma população de vírus homogênea, visto que, membros desta família viral podem sofrer com freqüência rearranjos genéticos entre seus três segmentos de RNA. O fenótipo das placas isoladas (FIGURA 11) foi bastante homogêneo, e a partir deste ponto, isolamos alguns clones aleatoriamente para realizar os ensaios de soroneutralização

A relação antigênica entre os clones virais e a amostra original do ORIV não-clonada contra o soro de coelho anti-Apeu foi realizada e podemos inferir que, não houve reatividade cruzada entre o anticorpo anti-Apeu e o vírus Oriboca (amostra não clonada), bem como seus clones obtidos.

A presença de reatividade cruzada entre duas amostras de vírus pode ser avaliada pela proteção da infecção celular pelo vírus quando esse é neutralizado por anticorpos neutralizantes (reação de NT). Uma vez que a prova de NT reflete as propriedades das estruturas de superfície, podemos concluir que o vírus Apeu e o vírus Oriboca não apresentam semelhanças entre

suas glicoproteínas, denominadas Gn e G (codificadas pelo segmento M). Sabe-se que, dentre os bunyavírus do grupo C, há um maior ou menor grau de relação, sendo este determinado pelas características antigênicas de cada membro e também responsável pela subdivisão entre sorotipos virais dentro do mesmo sorogrupo.

Já o ensaio da NT contra o fluido ascítico murino contendo anticorpos anti-arbo grupo C-I, se mostrou eficaz em proteger as células VERO da infecção pelo ORIV. Todos os clones virais escolhidos foram reconhecidos pelos anticorpos presentes no fluido ascítico e, sua infecção foi neutralizada, com títulos iguais aos obtidos para amostra original não clonada. Estes dados confirmam a homogeneidade dessas amostras.

Esses resultados confirmam dados sorológicos prévios realizados por Shope (1962). Eles verificaram que, de acordo com o tipo de prova sorológica empregada, os sorotipos em análise (Apeu, Caraparu, Itaqui, Marituba, Murutucu e Oriboca) apresentavam afinidades diferentes entre si (FIGURA 6). Por NT, o vírus Apeu não apresentou reatividade cruzada com o vírus Oriboca, mas sim pelo Caraparu.

O ORIV foi capaz de induzir grandes quantidades de IFN *in vitro*, utilizando-se as células murinas L929 em nosso modelo. Nós podemos observar que quanto maior a m.o.i. utilizada, maior foi a produção de IFN e também detectado em tempos mais precoces, ou seja, a indução de IFN foi diretamente proporcional à quantidade de vírus adicionada à monocamada celular (FIGURA 12). Esses dados corroboram com os obtidos por GOLGHER EM 1975 ao infectar fibroblastos de embrião de galinha com os arbovírus do grupo C. Este autor observou que um aumento da carga viral para a infecção dos fibroblastos acarretava numa maior liberação da substância até então não muito caracterizada, com atividade antiviral e que hoje conhecemos como interferon. Os dados também se assemelham aos verificados por MEZENCIO *et al* em 1978 ao utilizar em seu modelo experimental, o vírus Marituba para infectar também fibroblastos de embrião de galinha.

A produção do IFN lambda I recombinante através de transfecção transiente das células humanas 293T, foi perfeitamente viável para a obtenção deste IFN do tipo III. Porém a quantidade obtida mostrou-se pequena quando comparados aos dados da literatura. Padronizações para o processo serão ainda necessárias, para se atingir as melhores condições para a produção dessa citocina, visto o alto custo da mesma disponível comercialmente. Porém o título aqui obtido (6400 UI/mL) foi suficiente para a realização dos experimentos de atividade antiviral.

Este IFN foi capaz de proteger células VERO contra a infecção pelo EMC, dado obtido através do teste da atividade antiviral proposto por FERREIRA *et al* em 1977 e, também protegeu as células VERO contra a infecção pelo ORIV. Ainda não há descrições na literatura sobre a atividade antiviral dos IFNs do tipo III e esse membro dos *Orthobunyavirus* do grupo C. LIVONESI *et al* 2007 avaliou a atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* dos vírus Oropouche, Caraparu, Guama, Guaroa e Tacaiuma ao IFN α 2A e IFN α A murino, demonstrando que essa atividade também foi dependente da concentração do IFN, e do período de tratamento.

Os interferons desempenham um papel crítico no sistema imune inato, bem como no sistema imune adaptativo. Portanto a produção dessas citocinas é importante para se estabelecer um estado antiviral em células alvo, sendo esta atividade bastante verificada, em cultura de células. Depois de sua descoberta em 1957, os IFNs tipo I e II têm sido extensamente estudados. Hoje as funções dos IFNs do tipo I são bem caracterizadas e são essenciais para a montagem de uma resposta robusta contra as infecções virais (SADLER *et al*, 2008). Vale destacar que, os IFNs do tipo I se ligam ao mesmo receptor celular denominado IFNABR, composto por duas subunidades (IFNAR1 e IFNAR2).

Como as células Vero respondem bem a IFNs do tipo I e, são incapazes de produzi-los, elas se caracterizam como um ótimo modelo para o estudo da atividade biológica destas moléculas.

A atividade antiviral de IFNs do tipo I contra o ORIV foi dose dependente e, o IFN β , foi o IFN que mostrou maior eficiência na inibição da multiplicação do ORIV (FIGURAS 14 e 15). Isto pode estar relacionado à maior capacidade deste IFN em induzir ISGs (genes estimulados por interferon) relacionados à atividade antiviral em relação ao IFN α .

Adicionalmente foi demonstrado que, a inibição da multiplicação viral foi maior nas doses de 100 a 10000 UI/mL para o IFN- α e nas doses a partir de 0,1 UI/mL para o IFN- β . Ainda para o IFN- β , um aumento da dose de 100 para 1000 ou 10000 UI/mL não acarreta em uma diferença significativa na porcentagem de inibição do ORIV, já que sua multiplicação nestas três doses testadas, está totalmente inibida. Possivelmente os receptores estão já se encontravam saturados, quando um aumento da dose de IFN, não reflete em uma maior inibição da multiplicação do vírus.

A curva de multiplicação feita com células VERO tratadas com os dois IFNs do tipo I e, depois desafiada com o ORIV, confirmam essa maior atividade antiviral do IFN β *in vitro* (FIGURA 16). Possivelmente esta atividade diferencial dos IFNs, ocorre portanto devido às diferenças nas afinidades às cadeias do receptor celular, pois estes podem se encontrar agrupados em pequenas quantidades em rafts na membrana celular. Esses resultados confirmam dados prévios descritos para outros *Bunyavirus*, onde a multiplicação viral é inibida em células pré-tratadas com IFN (LIVONESI *et al*, 2007; ALMEIDA *et al*, 2008).

Os IFNs do tipo III foram recentemente identificados e têm demonstrado serem expressos em resposta às infecções virais e, por desencadear também uma atividade antiviral *in vitro*. A atividade biológica dos IFNs do tipo III mesmo redundantes com as atividades dos IFNs do tipo I, são em geral menos intensas e mais restritas como citado anteriormente. No entanto, este grupo de IFNs é capaz de interferir na multiplicação de vários vírus humanos e murinos. Esta foi a primeira vez que a sensibilidade do ORIV foi testada para esta classe de citocinas. Os IFNs do tipo III são produzidos também por diversos tipos celulares, o que indica que são importantes mediadores da resposta antiviral do

hospedeiro. Porém todas as atividades biológicas dos IFNs do tipo III ainda permanecem por serem esclarecidas completamente.

A estimulação de células VERO com o IFN- λ 1 foi capaz de proteger essas células, da infecção pelo ORIV quando administrado em doses muito superiores àquelas quando comparado aos IFNs α/β (FIGURA 17). Assim esse IFN do tipo III, diminuiu a multiplicação do ORIV em 50% em relação ao controle não tratado, não apresentando uma alta atividade antiviral como os IFNs do tipo I. A curva de multiplicação do ORIV em células VERO pré-tratadas com o IFN lambda 1 também foi feita (FIGURA 18), utilizando-se uma alta dose dessa citocina (1000 UI/mL), pois doses mais baixas que esta, não implicariam em uma inibição significativa do ORIV de acordo com a atividade antiviral observada na FIGURA 17. Este dado corrobora com os dados obtidos por MEAGER *et al* 2005 e ANK *et al*, 2006. Apesar de usarem diferentes receptores para desencadear as respostas imunes, os IFNs do tipo I e III parecem ser regulados por um mecanismo comum. Assim essa baixa especificidade do IFN lambda observada em relação aos IFNs α e β em muitos ensaios biológicos, necessitam de um melhor entendimento. Almeida *et al*, 2008 demonstrou também que, os IFNs lambda 1 e lambda 2 apresentaram uma atividade antiviral significativa contra o APEUV, de maneira dose dependente. A atividade apresentada pelos IFN tipo III foi independente da presença dos IFN tipo I, sendo que um co-tratamento de células VERO, com ambos os tipos de IFN não resultou em um aumento na atividade biológica destes. Adicionalmente Mordstein *et al*, 2008 concluiu que, o sistema IFN α/β é dominante sobre o sistema dos IFNs do tipo III.

Pouco se sabe sobre os possíveis efeitos sinérgicos da atividade antiviral dos IFNs do tipo I, quando combinados aos IFNs do tipo III. Nós observamos que, células VERO tratadas com uma combinação destes IFNs em doses altas ou baixas não tiveram um efeito antiviral aditivo sobre a multiplicação do ORIV. ANK *et al*, 2006 demonstrou que não existe efeito aditivo na atividade antiviral contra o vírus EMC ou vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2) quando IFN- α é combinado com IFN- λ *in vitro*. STOLTZ *et al*, 2007 por sua vez, demonstrou que, o IFN- γ (IFN do tipo II) quando combinado ao IFN- λ , acarreta em um efeito

sinérgico da atividade antiviral sobre a multiplicação do hantavírus (família *Bunyaviridae*), o mesmo não ocorrendo com a combinação com os IFNs do tipo I (IFNs α/β). Estes dados estão de acordo também com ALMEIDA *et al*, 2008 que, ao combinar IFNs do tipo I e III para tratar células VERO, não observou um sinergismo entre essas citocinas, contra a multiplicação do APEUV.

A expressão dos ISGs resulta de uma direta resposta frente a uma infecção viral, em adição a indução pelos IFNs. Então não é muito claro se a expressão observada desses genes é de fato induzida por IFNs ou por outras vias tais como a sinalização pelos receptores do tipo toll e/ou a ativação direta por componentes virais específicos. Alguns ISGs tais como MxA mostram uma fraca resposta primária à infecções virais mas parecem ser altamente responsivos aos IFNs do tipo I e tipo III.

Nós encontramos que, a expressão dos quatro ISGs testados (2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA) foi aumentada nas células A549 após infecção pelo ORIV (FIGURAS 21, 22, 23 e 24). O aumento da expressão dos genes 2'5'OAS foi detectado somente a partir de 24 h.p.i., enquanto que um aumento na expressão dos genes PKR e MxA foi percebido desde 6 h.p.i. e o gene 6-16 teve sua expressão detectada nos tempos de 18 e 24 h.p.i.

As proteínas Mx pertencem à vasta superfamília de GTPases tipo dinamina. Estas foram originalmente identificadas como fatores que conferiam resistência ao vírus letal da Influenza A em camundongos. A expressão de MxA humana é usada como marcador para a detecção de atividade biológica dos IFNs do tipo I gerada durante infecções virais, ou durante a administração dessas citocinas em terapias. Ainda não é claro se os genes Mx, bem como outros ISGs podem também ser induzidos diretamente por uma infecção viral ou RNA dupla-fita (via ativação de IRFs) (HOLZINGER *et al*, 2007).

Já foi demonstrado que MxA inibe a multiplicação viral de algumas famílias de vírus RNA, tais como *Orthomyxoviridae* (vírus Influenza A/C e vírus Thogoto), *Rhabdoviridae* (vírus da estomatite vesicular), *Paramyxoviridae* (vírus Measles

e vírus da Parainfluenza), *Togaviridae* (vírus Semliki Forest), e *Bunyaviridae* (vírus La Crosse e Hantavirus) (KIM *et al*, 2007).

Aebi *et al*, 1989 demonstrou que, em fibroblastos humanos, a expressão de MxA é fortemente induzida pelos IFNs α/β mas também pelo vírus Newcastle. Dados semelhantes foram obtidos por Goetschy *et al*, 1989 onde o gene MxA foi induzido pelos vírus Newcastle, Influenza e em menor extensão o vírus da estomatite vesicular. Kim *et al*, 2007 também encontrou que, a indução da expressão por MxA foi aumentada em 296 vezes, em células HUVECs, após três dias de infecção por Hantavírus e, mantida em altos níveis após sete dias de infecção por este membro da família *Bunyaviridae*.

Bandyopadhyay *et al*, 2005 trabalhou com linhagens celulares onde os genes para os IFNs do tipo I são deletados e estabeleceu que, a indução de diversos ISGs foi direta e não mediada pela síntese intermediária de interferon. Estes autores sugerem então, uma expressão de MxA em vias independente de IFN. A existência de tais vias é suportada também, por experimentos que mostram por exemplo que, Citomegalovírus pode ativar as respostas imunes em células deficientes para o sistema IFN (PRESCOTT *et al*, 2005).

Porém esses dados acima, contrastam com os obtidos por Holzinger *et al*, 2007, onde os autores demonstraram que, a expressão de MxA é induzida pelos IFNs do tipo I e tipo III, mas não diretamente pela infecção do vírus Influenza do tipo A. A indução de MxA foi dependente dessas citocinas e de uma via de sinalização funcional estimulada pelos interferons. Recentemente Almeida *et al*, 2008 demonstrou também que os IFNs $\alpha 2A$, $\lambda 1$ e $\lambda 2$ induziram níveis similares de 2'5'OAS e 6-16 e o gene MxA embora tenha sido algumas vezes relacionado com a atividade antiviral contra às infecções pelos bunyavírus (Hantavírus e vírus La Crosse), no modelo utilizado pelo autor, nenhuma indução desse gene foi demonstrada.

Os IFNs do tipo III parecem ser o que restou de um sistema de proteção antiviral ancestral, que tinha a função de proteger organismos primitivos, pois genes semelhantes aos IFNs tipo III ocorreram no genoma de peixes e parece

ter tido sua origem dos genes de IFN do tipo I. A coexistência de dois sistemas de defesa redundantes em vertebrados poderia ser explicado pela alta proteção conferida a uma variedade de patógenos e microrganismos e também para acelerar as respostas imunes (SOMMEREYNS *et al*, 2008). Os autores sugerem ainda que, a função primária dos IFNs lambda seja a proteção das estruturas epiteliais, pois muitos vírus usam as células epiteliais como sítios de replicação primária.

A atividade efetora dos IFNs do tipo I e III exógeno observada nos experimentos *in vitro* está relacionada à capacidade de inibição da multiplicação do ORIV por estas citocinas e foi devido à habilidade em induzir um estado antiviral, nas células através da expressão de proteínas antivirais como 2'5' OAS, 6-16 e PKR.

Com este trabalho mostramos que o ORIV é sensível aos IFNs do tipo I e III em maior ou menor grau e, embora utilizem receptores distintos para sinalizarem, essas duas famílias de IFN compartilham algumas características comuns, como as vias de transdução de sinais ativadas e os estímulos requeridos para a sua produção.

Nós podemos concluir que a atividade antiviral contra o ORIV foi redundante em relação aos IFNs I e III. E o IFN β o mais potente indutor do estado antiviral nas células testadas. Os dados sugerem que, o sistema imune inato desempenha um importante papel no controle do ORIV e um potencial terapêutico dos IFNs do tipo I e III no controle das arboviroses..

Mais estudos serão necessários para caracterizar a sensibilidade aos IFNs do tipo I e III para outros membros da família *Bunyaviridae*, bem como avaliar outros IFNs como o tipo II (IFN γ) e também o IFN lambda2 para membros dessa família.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1 – Bibliografias

AEBI M. *et al.* cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 9, p. 5062-5072, no. 11 Nov. 1989.

ALMEIDA G.M.F, OLIVEIRA D.B., MAGALHÃES C.L.B, BONJARDIM C.A, FERREIRA P.C.P, KROON E.G. Antiviral activity of tipe I interferons and interleukins 29 and 28^a (type III interferons) against Apeu vírus. *Antiviral Research*, 2008.

ANK N., *et al.* Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select vírus infections in vivo. *Journal Virology* vol.80 p.4501-4509 May 2006.

AQUINO V.H., ARRUDA E., FIGUEIREDO L.T.M. Brazilian Viruses in the Genus *Orthobunyavirus*. *Virus Reviews and Research*, v. 7 (2), p. 7-20, 2002.

AQUINO V.H., MORELI M.L., MORAES FIGUEREDO L.T. A simple method for purifyng the three genome segments of *Orthobunyavirus*. *Virus Reviews & Research*, v. 10, n^o1, p. 55-58, 2005.

AZEVEDO, R.S.S. *et al.* Arboviroses In: *Infectologia pediátrica*. Ed. Ateneu. São Paulo. p. 533-551, 2007.

BARR J.N., WERTZ G.W. Role of the conserved nucleotide mismatch within 3'-5'-terminal regions of Bunyamwera virus in signaling transcription. *Journal of Virology*, v. 79, p. 3586-3594, 2005.

BANDYOPADHYAY S. K. *et al.* Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3. *Jbc on line*. vol. 270, no 33. 2005.

BEATY B.J., CALISHER C.H., SHOPE. R.R. Arbovirus. In: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Seventh edition, p.189-212, 1995.

BISHOP D. H., CALISHER C.H., CASALS J., CHUMAKOV M.P., GAIDAMOVICH S.Y., HANNOUN C., LVOV D.K., MARSHALL I.D., OKER-BLOM N., BLAKQORI G., DELHAYE S., HABJAN M., BLAIR C.D., VARGAS I.S., OLSON K.E., YAZDI G.A., FRAGKLOUDIS R., KOHL A., KALINKE U., WEISS S., MICHIELS T., STAEHELI P., WEBER F. La Crosse Bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I system of mammalian hosts. *Journal of Virology*. p. 4991-4999. May. 2007.

BONJARDIM C.A. Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. LETT*. 2008.

BONJARDIM C.A., FERREIRA P.CP., KRON E.G. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses-and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect, reviews*, v. 7, p. 569-578, 2005.

BOWEN M. D., TRAPPIER S.G., SANCHEZ A.J., MEYER R.F., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., DUNSTER L.M., PETERS C.J., KSIAZEK T.G., NICHOL S.T. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*, v. 291, p. 185-190, 2001.

BUCKLEY S., SHOPE R.E. Comparative assay of arthropod-borne group C virus antibodies by tissue neutralization and hemagglutination-inhibition tests. *Amer. Journ. Trop. Med. Hyg.* 1961

CASALS, J. The arthropod-borne group of animal viruses. *Trans. New York. Acad. Sci*, v. 19, p. 219-235, 1957.

CAUSEY O.R., CAUSEY C.E., MAROJA O.M., MACEDO D.G. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 10, p. 227-49, 1961.

COELHO L.F.L., MOTA B.E.F., SALES P.C.M., MARQUES J.T.M., OLIVEIRA J. G., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C.P., KROON E.G. Integrin alpha 11 is a novel type I stimulated gene. *Cytoquine*. 2006.

DIAZ M.O., S.ZIEMIN *et al.* Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.85, n.14, Jul, p.5259-63.1988.

ELLIOT R. M.. Molecular Biology of the *Bunyaviridae*. Review Article. *J. Gen. Virol*, v. 71, p. 501-522, 1990.

FERREIRA P.C.P., 1977. Dissertação de Mestrado. Comparação de Métodos na Titulação de Interferon Humano em células Vero. Belo Horizonte, Lab. de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

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

FIGUEIREDO L.T.M., Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.40, n. 2, 2007.

FULHORST C.F., BOWEN M.D., HARDY J.L., ELDRIDGE B.F., CHILES R.E., JACKSON A.O., REEVES W.C. Geographic distribution and serologic and genomic characterization of Morro Bay virus, a newly recognized bunyavírus. *Am J Trop Med Hyg*, v. 54(6), p. 563-569, 1996.

GOETSCHY J.F. *et al.* Regulation of the interferon-inducible IFI-78K gene, the human equivalent of the murine Mx gene, by interferons, double-stranded RNA, certain cytokines, and viruses. *Journal of ViroLOGY*, vol. 63, no. 6. p. 2616-2622 June 1989.

GOUGHER R.R. Interferência por arbovírus do grupo C. Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para o concurso de professor titular da disciplina de Virologia Geral. 1975.

GONZALEZ-SCARANO F., NATHANSON N. *Bunyaviridae*. In B. N. Fields and D. M. Knipe (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. p. 1473-1504, 1996.

GONZALEZ-SCARANO F., SOLDAN S.S. Emerging Infectious diseases: the *Bunyaviridae*. *Journal of Neurovirology*, reviews, v. 11, p. 412-423, 2005.

GOODBURN S., DIDCOCK L., RANDALL R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 2341-2364, 2000.

GOULD E.A., HIGGS S, BUCKLEY A, GRITSUN TS. Potential arbovirus emergence and implications for the United Kingdom. *Emerging Infection Diseases*, Apr;12(4),2006.

GRIOT C, PEKOSZ A, LUKAC D, SCHERER S.S, STILLMOCK K, SCHMEIDLER D, ENDRES M.J, GONZALEZ-SCARANO F, NATHANSON N. Polygenic control of neuroinvasiveness in California serogroup bunyaviruses. *J Virol*. Jul;67(7),1993.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems- Reviews. *Archives of Medical Research*, v. 33, p. 330-342, 2002.

HALLER O., KOCHS G., WEBER F. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*. P.119-130.2006

HANAHAN D., JESSEE J., BLOOM F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzimology*, v. 204, p. 63-113, 1991.

HART T.J, KOHL A., ELLIOTT R.M. Role of the NSs protein in the zoonotic capacity of Orthobunyaviruses. *Zoonoses Public Health*. Sep. 2008.

HOLZINGER D. *et al.* Induction of MxA gene expression by Influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *Journal of Virology*. vol. 81, no. 14. p. 7776–7785 July 2007.

HUANG X. e MADAN A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, v. 9, p.868-877, 1999.

INNIS M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, 1990.

IVERSSON, L.B. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Rev.Inst.Med.Trop.v.4*, p.343-353, 1994.

JOKLIK, W.K. - Interferons. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. (Ed.). *Virology.*, 2ª Ed. New York, Raven Press Ltd. Cap. 16, p. 383-410, 1990.

JONKERS A.H., METSELAAR D., PÃES de ANDRADE A.H., TIKASINGH E.S. Restan virus, a new group C arbovirus from Trinidad and Surinam. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 16, p. 74-78, 1967.

KATZE M.G. *et al.* Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. *Nature Reviews. Immunology*. v.8 August.2008.

KIM I.W. *et al.* Interferon-stimulated genes response in endothelial cells following Hantaan virus infection. *J Korean Med Sci* p. 987-992. 2007.

KIM, S.H. *et al.* Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFN α R1 and IFN α R2. *Gene*, v.196, n.1-2, Sep 1, p.279-286. 1997.

KOHL A., LOWEN A.C., LÉONARD V.H.J., ELLIOTT R.M. Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. *Journal of Virology*, v. 87 p. 177-187, 2006.

KUNO G., CHANG G.J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct.p. 608-637, 2005.

LEÃO N.Q. *et al.* Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico. Ed.Cejup. Univ. Est.Pará. Inst.Evandro Chagas.886p.1997.

LEONARD V.H.J., KOHL A., HART T.J., ELLIOTT R.M. Interaction of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein with mediator protein MED8: a mechanism for inhibiting the interferon response. *Journal of Virology*, v. 80, p. 9667-9675, 2006.

LEVY D.E, SASTRE-GARCÍA A. The virus battle: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Elsevier Science* 143-146, 2001.

LEVY D.E., MARIÉ I., PRAKASH A. Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. *Current Opinion.*, v. 15, p. 52-58, 2003.

LOWEN A.C., BOYD A., FAZAKERLEY J.K., ELLIOTT R.M. Attenuation of bunyavirus replication by rearrangement of viral coding and noncoding sequences. *Journal of Virology*, v. 79, p. 6940-6946, 2005.

MAGALHÃES C.L.B. Propriedades Biológicas dos *Orthobunyavirus* do Grupo C: Apeu, Caraparu e Itaqui. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a Obtenção do Título de Mestre em Microbiologia. 2004.

MAGALHÃES C.L.B. *et al.* Caraparu virus (group C Orthobunyavirus): sequencing and phylogenetic analysis based on the conserved region 3 of the RNA polymerase gene. *Virus Genes*. p.681–684. 2007.

MEAGER A. *et al.* Biological activity of interleukins-28 and-29: Comparison with type I interferons. *Cytoquine*.2005.

MELLOR P.S. Replication of Arboviruses in Insect Vectors- Reviews. *J. Comp. Path.*, v. 123, p. 231-247, 2000.

MORDSTEIN M. *et al.* Interferon- λ contributes to innate immunity of mice against Influenza A but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog*.2008

MORELI ML, AQUINO VH, FIGUEIREDO LT. Identification of Simbu, California and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Jan-Feb 2001.

MEZENCIO J.M., PEIXOTO M.L., FERREIRA P.C., GOLGHER R.R. Induction of interferon by group C arboviruses. Brief report. *Arch Virol.*, v. 58(4), p. 356-358, 1978.

NALCA A., FELLOWS P.F., WHITEHOUSE C.A. Vaccines and animal models for arboviral encephalitides. *Antiviral Research.*, v. 60, p. 153-174, 2003.

NICHOL S.T., ARIKAWA J., KAWAOKA Y. Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad USA*, v. 97, p. 12411-12412, 2000.

NOVAES R.F.V. Caracterização molecular dos *Orthobunyavirus* do grupo C: Apeu BeAn848, Caraparu BeAn3994, Itaqui BeAn12797, Marituba BeAn15, Murutucu BeAn974 e Oriboca BeAn17. Dissertação de Mestrado Apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a Obtenção do Título de Mestre em Microbiologia. 2006.

NUNES M.R.T. *et al.* A febre do Oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia brasileira. *Cad.Saúde Colet.* Rio de Janeiro, 2007.

NUNES M.R.T., TRAVASSOS DA ROSA A.P., WEAVER S.C., TESH R.B., VASCONCELOS P.F. Molecular epidemiology of group C viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in the Americas. *Journal of Virology*, v. 79, p. 10561-10570, 2005.

OVERBY A.K., PETTERSSON R.F., GRUNEWALD K., HUISKONEN J.T., Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *PNAS*, vol.105, n.7,p.2375-2379Feb. 2008.

PEKOSZ A., GRIOT C., STILLMOCK K., NATHANSON N., GONZÁLEZ-SCARANO, F. Protection from La Crosse virus encephalitis with recombinant glycoproteins: role of neutralizing anti-G1 antibodies. *Journal of Virology*, v. 69, No 6, p. 3475-3481, 1995.

PETRILLO-PEIXOTO, M. L. Sensitivity of Group C Arboviruses (*Bunyaviridae*) to Human Amnion Interferon. *Intervirology*, v14, p.16-20, 1980.

PETTERSSON R.F., PORTERFIELD J.S., RUSSELL P.K., SHOPE R.E., WESTAWAY E.G. *Bunyaviridae. Intervirology*, v. 14, p. 125-143, 1980.

PINHEIRO F.P. *et al.* Arbovirose. In: Saúde na Amazônia. 2 ed. São Paulo 1983.

PLASSMEYER M.L., SOLDAN S.S., STACHELEK K.M., MARTÍN-GARCIA J., GONZÁLEZ-SCARANO, F. California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology*, v. 20, 338 (1), p. 121-132, 2005.

PRESCOTT J. *et al.* Induction of innate immune response genes by Sin Nombre Hantavirus does not require viral replication. *Journal of Virology*, vol. 79. no. 24 p. 15007–15015. Dec. 2005.

QUINAN B. R. Sequence and phylogenetic analysis of the large (L) segment of the Tahyna virus genome. *Virus Genes*. p.435–437. 2008.

ROSATO R.R., ROBBINS M.L., EDDY G.A. Structural components of Oriboca virus. *Journal of Virology*. p.780-787. Apr. 1974.

RUBINSTEIN S., FAMILLETTI P.C., PESTKA S. Convenient assay for interferons. *Journal of Virology*, v. 37, p. 755-758, 1981.

SADLER A.J., WILLIAMS B.R.G. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology* vol.8 July 2008.

SALANUEVA I.J., REYES R.N., CABEZAS P., LÓPEZ-IGLESIAS C., CARRASCOSA J.L., ELLIOTT R.M., RISCO C. Polymorphism and Structural Maturation of Bunyamwera Virus in Golgi and Post-Golgi Compartments. *Journal of Virology*, v. 77, No 2, p.1368-1381, 2003.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 1989.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMALJOHN C. S. AND NICHOL S.T. Bunyaviridae. In B. N. Fields and D. M. Knipe (ed.), *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. p. 1741-1780, 2007.

SEN, G.C. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*, v.55, p.225-281.2001.

SHOPE R.E., CAUSEY C.E., CAUSEY O. Itaqvi Virus a New Member of Arthropod - Borne Group C. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 11, p. 283-290, 1961.

SHOPE R.E., CAUSEY O.R. Further studies on the serological relationships of group C arthropod-borne viruses and the application of these relationships to rapid identification of types. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 11, p. 283-290, 1962.

SHOPE R.E., WHITMAN L. Nepuyo virus, a new group C agente isolated in Trinidad and Brazil. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 15, p. 772-774, 1966.

SHOPE, R. E. The Discovery of Arbovirus Diseases. *Ann. New. York Acad. of Sci.*, p. 138-145, 1993.

SOMMEREYNS C., PAUL S., STAEHELI P., MICHIELS T. IFN-lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-depedent fashion and primariliy acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* v.4.2008.

SONG J.W., SONG K.J., BAEK L.J., FROST B., PONCZ M., PARK K. *In vivo* characterization of the integrin $\beta 3$ as a receptor for Hantaan virus cellular entry. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 37, No 2, p. 121-127, 2005.

STOLTZ M. *et al.* Lambda interferon (IFN- λ) in serum is decreased in Hantavirus-infected patients, and in vitro-established infection is insensitive to treatment with all IFNs and inhibits IFN- γ -induced nitric oxide production. *Journal of Virology*. vol.81.n.16.2007.

TANIGUCHI T., TAKAOKA A. A weak signal strong responses: interferon- α/β revisited. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. v.2.May.2001.

TANYA A.M., JONATHAN O.C., BARRY J.B., RICHARD A.B., KEN E.O. Expression of Human MxA Protein in Mosquito Cells Interferes with La Crosse Virus Replication. *Journal of Virology*, v. 75, p. 3001-3003, 2001.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TURELL M.J., O'GUINN M.L., JONES J.W., SARDELIS M.R., DOHM D.J., WATTS D.M., FERNANDEZ R., TRAVASSOS DA ROSA A., GUZMAN H., TESH R., ROSSI C.A., LUDWIG V., MANGIAFICO J.A., KONDIG J., WASIELOSKI L.P.Jr, PECOR J., ZYZAK M., SCHOELER G., MORES C.N., CALAMPA C., LEE J.S., KLEIN T.A. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J Med Entomol.*, v. 42, p. 891-898, 2005.

UZÉ G., MONNERON D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie*.2007.

VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cad. Saude Publica*. 17 Suppl: p. 155-164, 2001.

VILCEK, J. Novel interferons. *Nature Immunology*, v. 4, p.8-9, 2003.

WEBER F., DUNN E.F., BRIDGEN A., ELLIOTT R.M. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a mini-replicon system. *Virology*, v. 281, p. 67-74, 2001.

WEBER F., BRIDGEN A., FAZAKERLEY J.K., STREITENFELD H., KESSLER N., RANDALL R.E., ELLIOTT R.M. Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Induction of Alpha/Beta Interferon. *Journal of Virology*, v. 76, p. 7949-7955, 2002a.

WEBER F., ELLIOTT R.M. Antigenic drift, antigenic shift and interferon antagonist: how bunyaviruses counteract the immune system. *Virus Research*., reviews, v. 88, p. 129-136, 2002b.

WEIDMANN M., RUDAZ V., NUNES M.R.T., VASCONCELOS P.F.C., HUFERT F.T. Rapid Detection of Human Pathogenic *Orthobunyavirus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, No 7, p. 3299-3305, 2003.

YANASE T., YOSHIDA K., OHASHI S., KATO T., TSUDA T. Sequence analysis of the medium RNA segment of three Simbu serogroup viruses, Akabane, Aino, and Peaton viruses. *Virus Res.*, v. 93, p. 63-69, 2003.

ZELÉNÁ H., JANUSKA J., RASZKA J. Micromodification of virus-neutralisation assay with vital staining in 96-well plate and its use in diagnostics of Tahyna virus infections. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* Aug. 2008.