

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós Graduação em Microbiologia
Laboratório de Vírus**

MARIETA TORRES DE ABREU ASSIS

**“Caracterização dos vírus ITAQUI e
CARAPARU (*Orthobunyavirus* do
sorogrupo C): patogênese e genes
induzidos da resposta imune inata”**

Tese 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 Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira

**Belo Horizonte
Abril - 2013**



MARIETA TORRES DE ABREU ASSIS

Tese de Doutorado

**“Caracterização dos vírus ITAQUI e
CARAPARU (*Orthobunyavirus* do
sorogrupo C): patogênese e genes
induzidos da resposta imune inata”**

**Belo Horizonte
Abril- 2013**

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que nada é ao acaso.”

(Antoine De Saint-Exupery)



Eu tenho uma porção de coisas para dizer, dessas coisas assim que não se dizem costumeiramente, sabe..., dessas coisas tão difíceis de serem ditas que geralmente ficam caladas, porque nunca se sabe nem como serão ditas nem como serão ouvidas.

Envelheci mais que o normal depois de 7 anos vividos no Laboratório de Vírus. Olho e nem me reconheço às vezes; o que é absolutamente aceitável neste contexto. Mas o lado bom da coisa é que eu cresci 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 conheci, nestes anos todos fossem mudar de planeta, ou talvez eu rsrs, como é estranho...(bem que alguns poderiam ir haha).

Claro que nem tudo foram flores nestes anos todos, isso eu já sabia que seria assim, mas eu não contava com algumas coisas. Principalmente na mudança de alguns, que julguei serem as melhores pessoas do mundo! Paciência... Assim a decepção fez parte desta trajetória também! Sabe pensando bem, no que tenho vivido e vendo desde o ano passado, se a vida profissional lá fora for só um amontoado de gente querendo ver os outros na pior, falando mal de colegas e chefes de maneira maldosa, eu prefiro mudar de planeta! Acho que vai ser mais efetivo que mudar de profissão né?! Mas chego também a seguinte conclusão, as pessoas digo, alunos e professores têm ao seu lado as pessoas que merecem! E se a falta de respeito é um exemplo e a palavra idiota uma rotina nos nossos ouvidos, eu só lamento por todas essas pessoas infelizes, porque é o único adjetivo cabível a elas. Que pena que elas foram perdendo suas qualidades ao longo do tempo... Quanta pena tenho delas... Diplomas, títulos, PhDs, artigos publicados, mas nenhum sentimento de respeito e humildade possuem! A vida, ao se desenrolar por acaso consulta faculdades? Pobre deles, a vida pode derrubar qualquer um... e ensinar de uma maneira dura. Eu bem sei disso e na minha própria pele! Precisava desabafar, porque calar não é solução e eu não disse!! E como já dizia Clarice Lispector "Porque há o direito ao grito. então eu grito"!

Bom deixando estas coisas de lado, deste tempo aqui quero levar os amigos feitos, as risadas gostosas, os dias felizes, o aprendizado e as horas loucas passadas no 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, respeito, tudo isso eu me permiti jogar fora, para que sobrassem 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 de que não me decepcionarei mais!

Então, para começar gostaria de agradecer a Deus e á Nossa Senhora de Oliveira, que me deu o necessário para chegar até aqui e também tenho certeza me deram outra

chance!! Eu sei que todos os dias quando eu acordo Deus dá um sorriso e diz: Estou te dando a chance de tentar de novo. E o que mais sonho é conseguir aproveitar plenamente esta oportunidade! Chego hoje diferente do que eu era, com algumas limitações, mas não menos agradecida!!

A minha família especialmente! Nossa aqui o bicho vai pegar rsrs. Bom mãezinha por onde começar com você?! Pode ser um clichê mas você me deu a vida uma vez e depois me trouxe a ela de volta depois do acidente! Eu jamais vou saber o que você passou, mas sempre vou me lembrar da sua força e fé! Exemplo para várias pessoas você foi e é! Você soube me oferecer exatamente o que eu precisava nas horas mais difíceis para que eu não desistisse e estivesse de pé aqui hoje defendendo minha tese. E não foram poucas essas vezes, né mãe? Há uma música antiga, muito bonita de um filme que a letra me lembra exatamente o que você é para mim: "...Você é quem me sustentou, nunca me deixou cair, você é quem me acompanhou, através disso tudo, você foi minha força quando eu estive fraca, você foi minha voz quando eu não podia falar, me ergueu quando eu não conseguia alcançar, você me deu fé porque você acreditou, eu sou tudo o que sou porque você me amou, você me deu asas e me fez voar, você tocou minha mão e eu pude tocar o céu, eu perdi minha fé, você devolveu-a de volta pra mim, você disse que estrela nenhuma estava fora de alcance, você me apoiou e eu fiquei de pé, eu tive seu amor, eu tive isso tudo, sou grata por cada dia que você me deu, talvez eu não saiba tanto, mas eu sei que isto é verdade, eu fui abençoada porque fui amada por você"...

Agradeço a você também Dindinha que me ajudou a me erguer e esteve ao meu lado naqueles tempos difíceis! Obrigada também pelo carinho, amor e apoio, eu não teria como agradecer-lhe mais, você foi fundamental na minha recuperação, nem sei como aguentou eu e meu cabelo lembra rsrs?! Igor e Júlia primos queridos, obrigada por me lembrarem que já estou velhinha e precisava sossegar hehe. Ao restante da família obrigada pela torcida e rezas pois é gente demais rs!!

Agradeço também aos meus bebês lindos: meu "pudim" lindo o Kito, Lulu e Sofião (esses fubás são uma peça rara) vocês me fazem muito feliz! Amo todos vocês!

Agradeço ao Augusto, pelo apoio, amor, companheirismo... te conhecer, mesmo naquelas circunstâncias foi um presente da vida!! Hoje sei bem quais são as pessoas que realmente fizeram a diferença e quais realmente fazem parte desse "eu" que eu me tornei, hoje e você é uma dessas pessoas!! Você é muito mais que uma pessoa importante na minha vida, é parte dela... ter sua companhia é o mesmo que estar vivendo com a certeza de que existem pessoas que realmente se importam conosco. Hoje sei, quais

são as pessoas que quero levar pra sempre comigo, e você é uma delas, pois você na minha vida faz uma grande e maravilhosa diferença. Amo você!

Agradeço também ao Tito e a Márcia que me receberam em sua casa num momento de apuros e hoje são uma família para mim, com direito a pacote completo com crianças lindas, Dudinha (uma princesinha linda que adoro) e a mais nova integrante da família a fofinha da Isabela. Mas claro que não ia me esquecer do Jimmyzão, o cão mais xuxu de BH, que torna os meus dias aqui muito mais felizes ao lado de vocês!!

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 coco depois do trabalho, para o salão de beleza, supermercado, dormir no carro porque chegou de ressaca no lab., traz comida gostosa de casa, leva também para o boteco para tomar umas, faz massagem para dor de cabeça (e cura na hora!), para 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? De 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 haha). Legal mesmo foi ter que dividir você com a Lelê, Gijalma, Bárbara, Jus, Flavinha, Ana P., Alice e tantas outras (afinal você é o homem melancia...rsrsrs). Você foi o melhor amigo, inclusive meu despertador várias vezes quando me ligava bem cedinho pra me acordar! Perfeito! E obrigada ufa, por não ter ido embora do lab. antes de mim (eu ia endoidar sem você lá rsrs). I love you so much para sempre e mais um pouco!! E não é layer hehehe!!! Nem preciso falar de que quando eu te vi lá no CTI do hospital, automaticamente me senti melhor, depois de ver minha mãe claro rsrs. Nunca vou me esquecer também da sua visita com os amigos do lab. em Oliveira...foi sensacional! Eu gostaria de lhe agradecer também ..."pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais"...

Ao meu chefe e sua mulher Jaqueline, olha nem sei o que 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! Obrigada por tudo, você e Jaque estiveram comigo nos momentos mais difíceis, e pela certeza eles tinham que tudo ia dar certo!

Aos meus amigos finalmente,

Á “canelada” de Oliveira (Neila, Dos Santos, Kaks, Gugli Geórgia), meu Deus nos conhecemos desde criança!! Somos amigas a mais de XX anos, haha não ousou fazer a conta, desnecessário denunciar nossas idades rsrs!! Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ela deseja ouvir. Difícil é ser amiga para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso e com confiança no que diz. E com vocês tudo isso é verdade! Com vocês aprendi que a verdadeira amizade não é inseparável, pois cada uma de nós trilhou um caminho diferente, pelo contrário é ter estado separadas tantas vezes, porém ainda sim nada ter mudado! Permanecemos umas ao lado das outras por pura lealdade e tenho maior orgulho disso, afinal “somos gente boa demais” rsrs né?! Obrigada imensamente pela companhia nestes XX rsrs anos todos e por terem me levantando de novo!! Sim vocês também foram minha força e minha fé, sem vocês não poderia ter ganhado aquela luta!! E aqui cabe um agradecimento em particular para a Kaks, poxa vida que barra você segurou amiga...ser uma fisioterapeuta e ter me visto naquela situação deve ter sido osso né (e ainda teve o tornozelo da Neila)?! Nossa cota já acabou rsrs... Bem o fato é que nada nesta vida é por acaso e você me ensinou a andar por este mundo de novo!! Mais que isso você me ensinou lições que vou guardar para sempre: humildade, perseverança, foco e tantas coisas mais! Você me fez levantar do chão, mesmo quando eu não tinha um... o meu muito obrigada de coração, devo tudo a isso a você também!!

Aos amigos: LeLê, Ana P, Katita, Gracinha, Vivi, Élice, Marcela, Barbrinha e Gi (não necessariamente nesta ordem rs), vocês são 10 e fizeram parte da minha história no lab. Amo vocês demais cambada!! Quantos churrascos aqui no ICB, noitadas e muitas farras! Choros também foram muitos rs e estamos aí prontas pra outra não é galera?! E como damos trabalho kkk! E os botecos então... inesquecíveis!! Enfim, vocês fazem parte da trupe de JR, e eu amo a convivência diária (café da manhã, almoço e trabalho com muita zoação) com vocês! Obrigada pelos conselhos que não foram poucos! Obrigada também por terem me salvado várias vezes da loucura absoluta neste doutorado rs!! A palavra amizade faz mais sentido por causa também de vocês!! Amo todos!!

Aos amigos de bancada deixo bem claro: pessoas do bem, sem o gene mala ou gene mal educado super expresso haha, mesmo que às vezes o gene loucura esteja presente kkkk: Eliseujalma, Tamara, Elisa, Hélina, Ariádyna, Andréia, Iara, Galileu Fábio, Lorena. Vocês contribuíram para que o clima do lab. ficasse menos pesado nestes últimos tempos! Se esqueci alguém minhas desculpas, Lab.Vírus é gente demais!!!

Aos funcionários do Lab.: Tia Ângela mesmo que já tenha se aposentado, fez parte da minha caminhada no Lab. (sempre estava com aquela carinha boa e tem um humor excepcional!). À Gisele que é uma gracinha e segura todo o trabalho pesado do lab. Á Paulinha e aos demais do apoio técnico, sem eles nada feito por aqui!

Obrigada aos demais professores do laboratório pela convivência e aprendizado, especialmente à Giliane que é uma fofa que eu adoro e admiro e desde que cheguei à UFMG sempre foi um xuxu de pessoa!! Obrigada pela amizade, cafés e almoços engraçados com Jon Jon!

Obrigada especial vai também para todos aqueles que me apoiaram no momento mais difícil da minha vida, mesmo para aqueles que não estão mais ao meu lado!! Ver a carinha de alguns, enquanto estava lá no hospital, me fez sentir a pessoa mais especial do mundo e me sentir muito amada! Vocês me fizeram querer ainda mais me levantar naquela época!!

Obrigada também vai para Cintilante e Flavinho que hoje fazem parte da banca, o carinho de vocês também me fizeram estar aqui hoje! Cintilante a “mãe” dos bunya do lab. haha que sempre me ajudou muito! Katita, que me ajudou também imensamente na reta final com as PCR em tempo real!! Um agradecimento especial também vai pra Carlinha que também é uma “Pepete” rs, são muitos anos nessa lida com os Bunya e isso é muito bom!! E sua ajuda sempre foi muito bem vinda, inclusive na parte do sequenciamento do ITQV que eu amo rsrs.

E o que eu aprendi afinal?! Aprendi somente o necessário para continuar e buscar novos sonhos... e principalmente aprendi que a minha existência pode mudar para sempre, em poucas horas, por causa de gente que eu nunca vi antes. E que também diplomas na parede não me fazem mais respeitável ou mais sábio. E por fim aprendi que algumas pessoas vão embora da nossa vida de qualquer maneira, mesmo que desejemos retê-las para sempre (isso vai em especial para um amigo que tive durante todos esses anos no lab., o Jonas), e que faz falta demais!!

Enfim, dedico esta tese para aquelas pessoas que me fizeram sorrir nestes últimos anos... Para a galera que sempre esteve junta. 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! Que bom que pude estar hoje aqui concluindo isto tudo!!

RESUMO

Os arbovírus do grupo C, Itaqui (ITQV) e Caraparu (CARV) (gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*) - foram isolados em um estudo sobre a ocorrência de arbovírus na Amazônia brasileira durante os anos 50. Apesar de serem patogênicos ao homem, terem sido isolados a mais de cinco décadas, estarem presentes em áreas que ultrapassam a fronteira da Amazônia e serem considerados potenciais arbovírus emergentes no Brasil, os estudos envolvendo estes vírus ainda são escassos. Neste trabalho foram realizados estudos biológicos “*in vitro*” e “*in vivo*” para uma melhor caracterização destes vírus. Os dois vírus foram capazes de multiplicar em células VERO, alcançando altos títulos virais. Os resultados sorológicos feitos através da soroneutralização confirmaram dados sorológicos prévios realizados por Shope (1962). Os interferons (IFN) constituem uma família heterogênea de citocinas com importantes atividades imunomodulatórias e representam a primeira linha de defesa do sistema imune inato contra uma infecção viral. Os IFN 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 antiviral, que limita a disseminação dos vírus. Neste estudo, nós avaliamos a atividade antiviral dos IFN tipo I e tipo III contra o ITQV. A atividade antiviral de IFN do tipo I contra o ITQV foi dose dependente e o IFN β foi o IFN que mostrou maior eficiência na inibição da multiplicação do ITQV. Já o IFN- $\lambda 2$, este também foi capaz de proteger essas células, da infecção pelo ITQV quando administrado em doses muito superiores àquelas quando comparado aos IFN α/β . Nós encontramos também que, a expressão dos quatro ISGs testados (2’5’OAS, PKR, 6-16 e MxA) e IRF7, bem como dos IFN β , $\lambda 1$ e $\lambda 2/3$ foi aumentada nas células A549 após infecção pelo ITQV. Os dados sugerem que, o sistema imune inato desempenha um importante papel no controle do ITQV. O desenvolvimento de modelos experimentais para estudar os mecanismos de replicação dos orthobunyavírus é de suma importância para o entendimento da patogênese e demais aspectos da infecção por estes vírus. Assim neste trabalho nós demonstramos que, a susceptibilidade dos camundongos a estes dois vírus foi idade-dependente, reforçando a importância do sistema imune adaptativo e inato frente à infecção. Já em camundongos BALB/C adultos jovens, a infecção pela via subcutânea (SC) com o ITQV demonstrou que, os animais infectados não desenvolveram sinais clínicos da doença, mas a replicação viral foi documentada no fígado e soro destes animais. Além disso, altos títulos de IFN foram observados em animais infectados mostrando uma efetiva montagem da resposta imune inata. Alterações histopatológicas também foram detectadas no fígado, consistente com um quadro de hepatite aguda, a qual foi confirmada com o aumento das transaminases hepáticas. A infecção pelo ITQV foi capaz também de induzir a formação de altos títulos de anticorpos neutralizantes. A expressão de algumas citocinas e quimiocinas estava bastante elevada e nós detectamos altos níveis de algumas delas no fígado dos animais infectados pelo ITQV. Já os animais infectados pela mesma via com o CARV apresentaram sinais clínicos de doença, como perda de peso significativa, pilo-ereção, arqueamento de dorso, intenso edema facial e respiração superficial com 100% de mortalidade no 18° d.p.i. Os achados histopatológicos, a produção de IFN, de anticorpos e a elevação na expressão de algumas citocinas/quimiocinas foram semelhantes aos dados encontrados após a infecção pelo ITQV. Assim podemos concluir que, a infecção pela via SC utilizando os orthobunyavírus Itaqui e Caraparu se mostrou uma ótima via de inoculação, pois mimetiza a infecção natural por estes vírus, causando sinais clínicos evidentes no caso do CARV. Porém, mais estudos serão necessários para melhor caracterizar estes dois bunyavírus.

SUMÁRIO

Página

Lista de abreviaturas	01
Lista de figuras e tabelas	03
I – INTRODUÇÃO	05
1.1 – Arbovírus	06
1.1.1 – Características gerais dos arbovírus	06
1.1.2 – Etimologia e histórico	08
1.1.3 – Arbovírus isolados no Brasil	09
1.1.4 – Ecologia, epidemiologia e emergência dos arbovírus	10
1.1.5 – Novos bunyavírus recentemente descobertos	13
1.2 - A Família <i>Bunyaviridae</i>	14
1.2.1 – Estrutura e genoma do vírus	15
1.2.2 – Multiplicação viral	19
1.2.3 – Patogenia, manifestações clínicas e tratamento	21
1.3 – Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	24
1.3.1 – <i>Orthobunyavirus</i> do Grupo C	26
1.4 – Modelos experimentais para os <i>Bunyavirus</i>	34
1.5 – A imunidade inata e os bunyavírus	36
1.5.1 – Interferons	36
1.5.2 – Interferons do tipo I, II e III	40
1.5.3 – Mecanismos de escape ao sistema imune pelos bunyavirus	43
1.5.4 – Interferons e os <i>Orthobunyavirus</i>	46
II – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	49
III – FLUXOGRAMA DE TRABALHO	53
3.1 – Caracterização biológica “in vitro”	54
3.2 – Caracterização biológica “in vivo”	55
IV – OBJETIVOS	56
4.1- Objetivo geral	57
4.2- Objetivos específicos	57
4.2.1 – Caracterização biológica “in vitro” do ITQV	57
4.2.2 – Atividade antiviral dos IFN contra o ITQV	57

4.2.3 – Caracterização biológica “ <i>in vivo</i> ” do ITQV e CARV -----	58
V- MATERIAIS E MÉTODOS -----	59
5.1- Cultivo de Células -----	60
5.2 – Meio de Cultura e subcultivos -----	60
5.3 – Amostra de vírus -----	61
5.3.1 – Origem -----	61
5.3.2 – Multiplicação viral -----	61
5.4 – Titulação de vírus -----	61
5.4.1 – Titulação pelo método de placa modificado... -----	61
5.5 – Purificação do vírus (Dulbecco, 1954) -----	62
5.6 – Anticorpos -----	62
5.7 – Ensaio de soroneutralização -----	63
5.8 – Atividade antiviral dos IFN do tipo I e tipo III contra o ITQV -----	64
5.9 – Indução dos genes estimulados por IFN (ISGs) -----	64
5.9.1 – Extração de RNA total celular -----	64
5.9.2 – Reação de transcrição reversa (RT) -----	65
5.9.3 – Reação em cadeia da polimerase- PCR em tempo real -----	65
5.10 – Animais -----	66
5.10.1 – Origem -----	66
5.10.2 – Anestesia -----	66
5.10.3 – Infecção de camundongos Balb/c neonatos -----	67
5.10.3.1 – Observação dos sinais clínicos e determinação da LD ₅₀ -----	66
5.10.4 – Infecção de camundongos Balb/c adultos via SC -----	67
5.10.4.1 – Observação dos sinais clínicos -----	68
5.10.4.2 – Obtenção dos órgãos e análise histopatológica -----	68
5.10.4.3 – Produção de anticorpos, IFN e viremia -----	69
5.10.4.4 – Extração RNA do soro dos animais -----	72

5.10.4.5 – Atividade das transaminases hepáticas -----	72
5.10.4.6 – Amplificação do genoma do CARV -----	73
5.10.4.7 – Cinética de expressão citocinas e quimiocinas -----	75
5.11 – Análises estatísticas -----	76
VI – Resultados -----	78
6.1 – Caracterização ITQV (BeAn 12797) -----	79
6.1.1 – Curva de multiplicação e ECP em células VERO do ITQV -----	79
6.1.2 – Purificação de placas do ITQV pelo método de Dulbeco -----	80
6.1.3 – Ensaio de soroneutralização -----	80
6.1.4 – Avaliação da atividade antiviral de IFN do tipo I -----	81
6.1.5 – Avaliação da atividade antiviral de IFN do tipo III -----	83
6.1.6 – Indução dos ISGs e dos IFN do tipo I e III -----	85
6.1.6.1 – Níveis de indução dos ISGs MxA, 6-16, 2'5' OAS e PKR -----	85
6.1.6.2 – Níveis de expressão dos IFN do tipo I e III -----	87
6.1.7 – Infecção de camundongos Balb/c com o ITQV -----	88
6.1.7.1 – Infecção de camundongos Balb/c neonatos com o ITQV -----	88
6.1.7.2 – Infecção de camundongos Balb/c adultos com o ITQV -----	89
6.1.7.2.1 – Ensaio de soroneutralização -----	91
6.1.7.2.2 – Isolamento do vírus ITQV e indução do IFN -----	92
6.1.7.2.3 – Dosagem de enzimas hepáticas -----	93
6.1.7.2.4 – Cinética de expressão de citocinas e quimiocinas -----	94
6.2 – Caracterização CARV (BeAn 3994) -----	96
6.2.1 – Infecção de camundongos Balb/c neonatos com o CARV -----	97
6.2.2 – Infecção de camundongos Balb/c adultos com o CARV -----	98
6.2.2.1 – Ensaio de soroneutralização -----	103
6.2.2.2 – Isolamento do vírus CARV e indução do IFN -----	104
6.2.2.3 – Detecção de vírus em animais infectados por PCR -----	105

6.2.2.4 – Dosagem de enzimas hepáticas -----	106
6.2.2.5 – Quantificação do CARV no soro e fígado -----	107
6.2.2.6 – Cinética de expressão de citocinas e quimiocinas -----	109
VII – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES -----	112
VIII – CRONOGRAMA DE TRABALHO -----	127
8.1 – Cronograma -----	128
IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	129
9.1- Referências bibliográficas -----	130
X – Anexos -----	154
10.1 – Produção bibliográfica -----	155

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: 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

CARV: vírus Caraparú

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CMC: carboximetilcelulose

cRNA: RNA complementar

DEPEC: dietilpirocarbonato

DMEM: meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DMEM1SF: DMEM 1% de SFB

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

ECP: efeito citopático

EMCV: vírus da encefalomiocardite murina

FC: fixação do complemento

HTNV: 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

IH: inibição da hemaglutinação

IRFs: fatores regulatórios de IFN

ISGs: genes estimulados por interferon

ISGF3: fator gênico estimulado por interferon 3

ISRE: elemento responsivo estimulado por interferon

ITQV: vírus Itaqui

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
TAHV: vírus Thayna
Tyks: tirosinas quinases
UFP: unidades formadoras de placas
vRNA: RNA viral

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Ciclo biológico dos arbovírus	07
Figura 2 – Distribuição geográfica de alguns importantes arbovírus	13
Figura 3 – Partícula viral característica da família <i>Bunyaviridae</i>	16
Figura 4 – Ciclo de multiplicação dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	20
Figura 5 – Disseminação dos arbovírus em vertebrados	24
Figura 6 – Mapa da localização da área do estado do Pará... ..	29
Figura 7 – Cenário dos primeiros isolamentos virais: fotografias	30
Figura 8 – Relações sorológicas entre os vírus do grupo C... ..	31
Figura 9 – Análise ultraestrutural dos vírus do grupo C	32
Figura 10 – Representação esquemática da estimulação da expressão dos ISGs --	37
Figura 11 – Representação esquemática da via de sinalização dos IFN... ..	39
Figura 12 – Curva de multiplicação do ITQV	79
Figura 13 – Atividade antiviral do IFN α 2A e IFN β recombinante contra o ITQV	82
Figura 14 – Curva de multiplicação do ITQV em células tratadas com IFN... ..	82
Figura 15 – Atividade antiviral do IFN λ 2 contra o ITQV	84
Figura 16 – Curva de multiplicação do ITQV em células tratadas com IFN λ 2	84
Figura 17 – Níveis de ISG em células A549 após infecção com o ITQV	86
Figura 18 – Níveis de IFN em células A549 após infecção com o ITQV	88
Figura 19 – Sobrevida de camundongos Balb/c neonatos infectados com o ITQV ---	89
Figura 20 – Aspectos histopatológicos de parênquima hepático	91
Figura 21 – Título de Ac neutralizantes anti-ITQV no soro dos animais	92
Figura 22 – Título de IFN no soro de camundongos Balb/c	93
Figura 23 – Níveis de ALT e AST no soro de Balb/c infectados com o ITQV	94
Figura 24 – Cinética de expressão de citocinas após infecção pelo ITQV	95
Figura 25 – Cinética de expressão de quimiocinas após infecção pelo ITQV	96

Figura 26 – Sobrevida de camundongos Balb/c neonatos infectados com o CARV--	98
Figura 27 – Sobrevida de camundongos Balb/c adultos jovens... -----	99
Figura 28 – Evolução do peso de camundongos Balb/c adultos infectados... -----	99
Figura 29 – Fotografias: camundongos Balb/c infectados com o CARV-----	100
Figura 30 – Fígado e baço de camundongos Balb/c infectados com o CARV -----	101
Figura 31 – Viremia fígado camundongos Balb/c infectados com o CARV -----	101
Figura 32 – Aspectos histopatológicos de parênquima hepático de camundongos --	102
Figura 33 – Título de Ac neutralizantes anti-CARV no soro dos animais -----	103
Figura 34 – Título de IFN no soro de camundongos Balb/c infectados pelo CARV --	104
Figura 35 – Detecção de vírus no sangue de camundongos Balb/c infectados -----	105
Figura 36 – Detecção de vírus no fígado de camundongos Balb/c infectados -----	106
Figura 37 – Níveis de ALT e AST no soro de Balb/c infectados com o CARV -----	107
Figura 38 – Detecção de RNA viral no soro de camundongos Balb/c infectados -----	108
Figura 39 – Detecção de RNA viral no fígado de camundongos Balb/c infectados --	108
Figura 40 – Cinética de expressão de citocinas após infecção pelo CARV-----	110
Figura 41 – Cinética de expressão de quimiocinas após infecção pelo CARV -----	111
Tabela 1 – <i>Orthobunyavirus</i> : sorogrupos e alguns exemplares -----	25
Tabela 2 – Classificação sorológica dos vírus do grupo C... -----	28
Tabela 3 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para ISGs... -----	66
Tabela 4 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para HPRT, citocinas... ----	76

I – INTRODUÇÃO

1.1 – Arbovírus

1.1.1 – Características gerais dos arbovírus

Os arbovírus são definidos como vírus que na natureza podem infectar artrópodes hematófagos através da ingestão de sangue de vertebrados infectados. Tais vírus tem a capacidade de multiplicar-se nos tecidos do artrópode vetor sendo posteriormente transmitido através de picadas para vertebrados susceptíveis (MELLOR, 2000).

Assim sendo, este grupo particular de vírus têm que apresentar os seguintes requisitos para serem classificados como arbovírus: infectar vertebrados e invertebrados, iniciar uma viremia suficiente em um hospedeiro vertebrado por tempo e títulos suficientes para permitir infecção do vetor invertebrado e iniciar uma infecção produtiva, persistente da glândula salivar do invertebrado a fim de fornecer vírus para infecção de outros animais hospedeiros.

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).

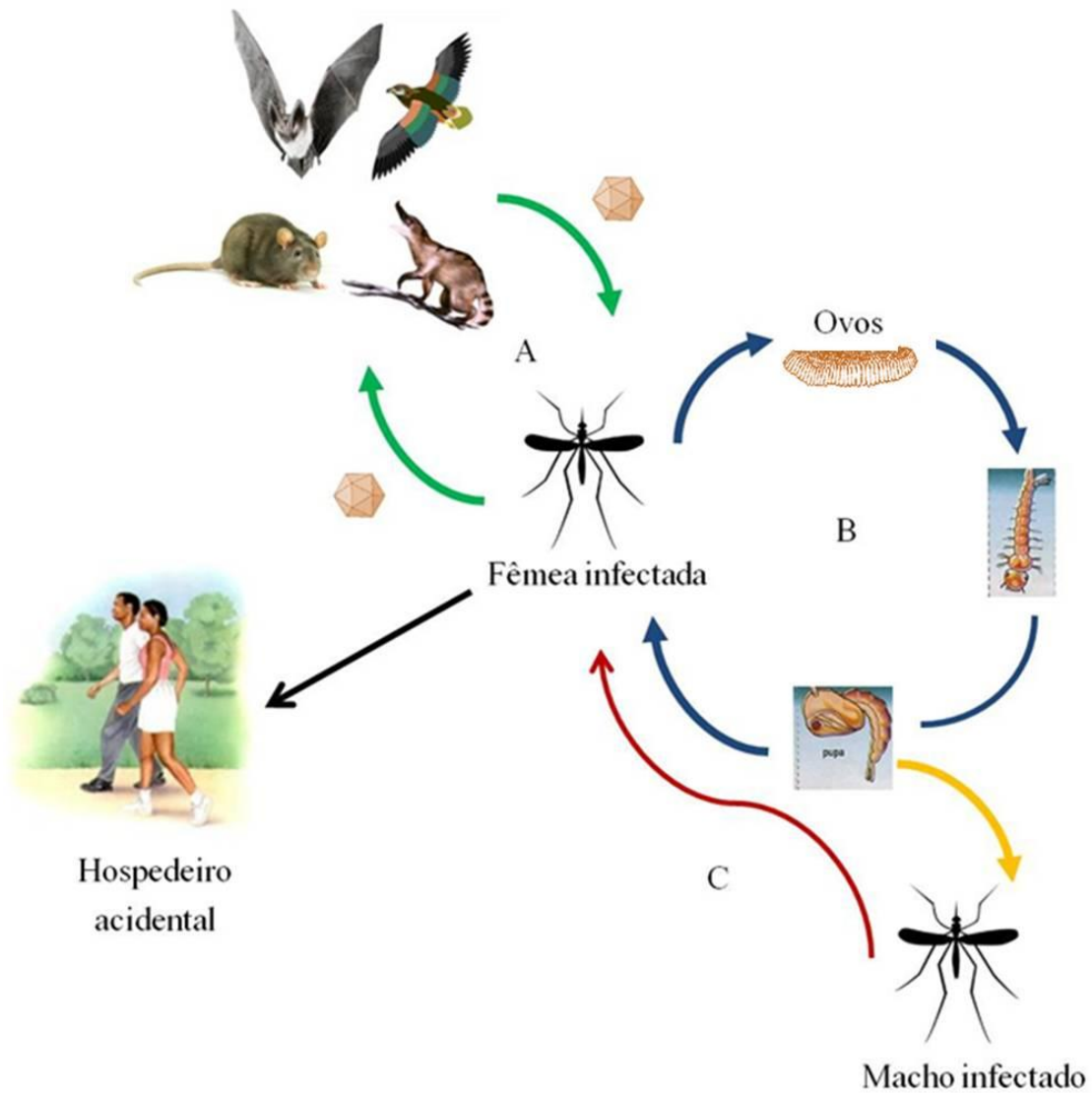


Figura 1 – Ciclo biológico dos arbovírus. A – Ciclo de amplificação em mamíferos, na qual a fêmea infectada poderá transmitir o vírus para pequenos mamíferos que, por sua vez, desenvolvem uma curta, mas alta viremia, podendo levar a infecção de artrópodes hematófagos, já infectados ou não. B – Ciclo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

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).

1.1.2 – Etimologia e histórico

O termo “arthropod borne viral encephalitis” foi introduzido por Hammon e Reeves por volta de 1942 quando estes pesquisadores começaram a estudar e caracterizar um grupo particular de vírus que eram transmitidos por artrópodes e causavam encefalites. Esse grupo era constituído por vírus tais como os das encefalites de S^t. Louis e Japonesa, das encefalites Eqüinas do Leste e do Oeste, transmitidos por mosquitos e o vírus da Encefalite Russa, transmitido por carrapatos. Hammon um pouco mais tarde, propôs o termo “arbo” para designar tais vírus ao constatar que alguns deles produziam outras doenças e não somente encefalites. Tais zoonoses tinham o homem como hospedeiro acidental (SMITH, 1959; HAMMON, 1961).

Em 1951, Sabin e colaboradores obtiveram hemaglutininas do vírus da encefalite Japonesa B por extração de cérebros infectados de camundongos. Posteriormente em 1953, Chanock & Sabin realizaram um estudo detalhado das hemaglutininas do vírus encefalite de S^t. Louis, onde estes descreveram métodos de obtenção adequados e discutiram seu uso nos testes de hemaglutinação com específicos antissoros e o uso de tal teste para diagnóstico da encefalite de S^t. Louis (ZHDANOV *et al.*; 1961).

Casals & Brown em 1954 dividiu os tais vírus em dois grupos distintos A e B com base em testes de inibição da hemaglutinação (HA) e, pouco mais tarde em 1957, Jordi Casals reuniu definitivamente aquelas peculiaridades, elaborando uma classificação antigênica, baseada fundamentalmente nas provas de Inibição da Hemaglutinação (IH), Fixação do Complemento (FC) e Neutralização (NT). Porém, somente em 1958 o grupo C foi adicionado a este grande grupo de vírus por Casals & Clarke (CASALS & BROWN, 1954; SMITH, 1959, ZHDANOV *et al.*; 1961).

Em 1963 foi criada e recomendada para ser utilizada em todo o mundo, a denominação “arbovírus”, com a finalidade de substituir a expressão “arthropod

born viruses”, e o prefixo “ARBO” do ponto de vista etimológico é um termo criado retirando-se as duas primeiras letras desta expressão.

Então os arbovírus ficaram divididos em três sorogrupos bem definidos: sorogrupo A (membros da família *Togaviridae*), sorogrupo B (membros da família *Flaviviridae*) e sorogrupo C (restrito ao gênero *Orthobunyavirus*, família *Bunyaviridae*) que foram então denominados arbovírus (CASALS, 1957). No Brasil os estudos dos arbovírus teve início em 1954 com o estabelecimento do primeiro laboratório de vírus na Amazônia no Instituto Evandro Chagas.

1.1.3 – Arbovírus isolados no Brasil

O Laboratório de Vírus de Belém, do Instituto Evandro Chagas no Pará (IEC) foi estabelecido pelo Serviço Especial de Saúde Pública (hoje Fundação Nacional de Saúde) e pela Fundação Rockefeller para isolar e estudar os arbovírus na região Amazônica (CAUSEY *et al.*, 1961).

No IEC, 195 diferentes espécies de vírus foram identificadas 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. Tais arbovírus encontrados na Amazônia são distribuídos em 21 grupos sorológicos e, cerca de quatorze 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).

Através de estudos laboratoriais e de campo realizados durante o curso das inúmeras epidemias ocorridas naquela região, os arbovírus foram inicialmente classificados por sorologia, principalmente por reação de neutralização (NT), inibição da hemaglutinação (IH) e fixação do complemento (FC) e posteriormente confirmados por análises moleculares e morfogênese para fins taxonômicos (BEATY *et al.*, 1995).

Numa área próxima a cidade de Belém no Pará, os estudos realizados no período de 1954 a 1959 possibilitaram o isolamento de cinco arbovírus. Estes vírus foram isolados do homem, de animais sentinelas e de mosquitos, a saber, Apeu, Caraparu, Marituba, Murutucu e Oriboca. Tais vírus são imunologicamente relacionados entre si, distintos dos outros arbovírus e constituem um novo grupo antigênico, o grupo C definido por Casals & Whitman em 1961, data em que ocorreram as primeiras pesquisas publicadas sobre os arbovírus do grupo C. Posteriormente novos membros deste grupo foram descritos: o vírus Itaqui foi isolado ainda em Belém por Shope e colaboradores e pouco mais tarde em 1966 o vírus Nepuyo foi também descrito por Spence e colaboradores (CAUSEY *et al.*, 1961; PEIXOTO, 1977).

1.1.4 – Ecologia, epidemiologia e emergência dos arbovírus

A floresta amazônica é assim uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, não só devido às condições climáticas favoráveis, mas também a grande diversidade da fauna e flora, com abundante variedade de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres, que constituem os elementos fundamentais para a manutenção desses vírus (PINHEIRO *et al.*, 1983; Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Os arbovírus são taxonomicamente diversos, pertencendo a 8 famílias e 14 gêneros. Atualmente, existem 547 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).

Alguns arbovírus são de importância para a saúde pública devido à habilidade em causar doença grave 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 o arbovírus que mais acomete o homem na Amazônia depois do vírus da dengue. Estudos soroepidemiológicos realizados no Brasil e nas Américas indicam várias epidemias entre 1961 e 2007, com aproximadamente 357.000 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 (chuva, temperatura), 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).

Patógenos emergentes podem causar doenças já conhecidas ou novas doenças e, dentro deste contexto as doenças zoonóticas emergentes causam uma grande preocupação aos cientistas nos dias atuais. Durante as últimas décadas vários surtos de patógenos emergentes e re-emergentes, têm ocorrido, afetando não só populações locais como também milhões de pessoas no caso das pandemias. Entre os exemplos notáveis estão vírus influenza A, vírus Ebola, vírus da hepatite C, vírus da insuficiência respiratória grave de adultos (SARS) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HJELLE & TORRES-PÉREZ, 2010).

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 falta de controle de artrópodes vetores; 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). Os arbovírus são distribuídos mundialmente (FIGURA 2) e representam aproximadamente 30% de todas as doenças infecciosas emergentes ocorridas durante a década passada, na qual a emergência ou re-emergência de doenças virais aumentou frequentemente e tornou-se muitas vezes um sério problema de saúde pública com graves perdas econômicas. Vírus tais como West Nile (WNV), Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo (CCHFV) e Febre de Rift Valley (RVFV) que são patogênicos para o homem e animais, têm emergido para fora de suas áreas endêmicas, causando epidemias na América do Norte, Europa e Península Arábica (LE MAY & BOULOY, 2012).

Recentes estudos no que se refere à emergência dos arbovírus demonstraram também que, mudanças na gama de hospedeiros e a eficiência de infecção/replicação destes vírus podem ocorrer através de mutações pontuais em seus genomas, gerando surtos que podem ser associados com estas mudanças na gama de hospedeiro e à adaptação a novos vetores (COFFEY, *et al.*, 2013).

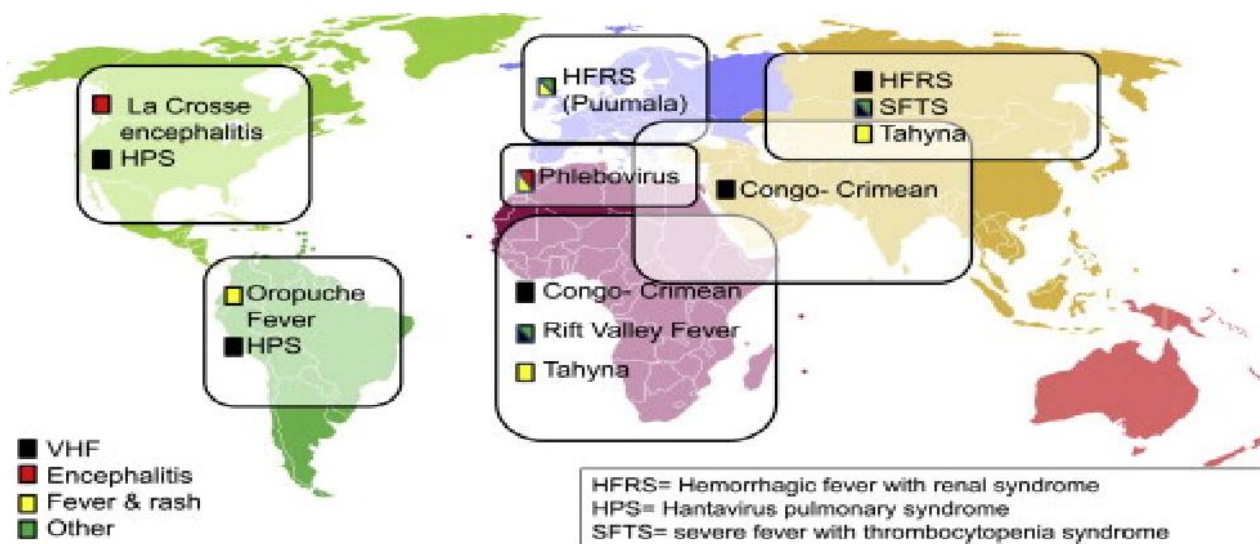


Figura 2 – Distribuição geográfica de alguns importantes arbovírus da família *Bunyaviridae*.

Fonte: MELTZER, 2012.

1.1.5 – Novos bunyavírus recentemente descobertos

Todas as mudanças supracitadas, têm favorecido a emergência e re-emergência dos arbovírus. Entre esses patógenos, muitos são membros da família *Bunyaviridae*, uma grande família de vírus RNA. Como exemplos de novos patógenos emergentes pertencentes a esta família, podemos citar um novo phlebovírus isolado na China, que é transmitido por carrapatos denominado vírus Huaiyangshan (HYSV) que vinha causando surtos em províncias chinesas desde 2009 e que foi isolado em 2011. Tal vírus causa um quadro de trombocitopenia, leucopenia e disfunção de múltiplos órgãos e a doença causada por este agente foi denominada de febre grave com trombocitopenia (SFTS) (YU, *et al.* 2011).

Ainda, Blitvich e colaboradores em 2012 isolou um novo bunyavírus, a partir de mosquitos, durante estudos conduzidos entre 2007-2008 na Península de Yacatan no México. Tal vírus foi denominado a princípio de vírus Cholul (CHLV). Além disso, os autores demonstraram através de sequenciamento,

que este novo membro da família *Bunyaviridae* é um rearranjo entre os vírus Cache Valley (CVV) e Potosi (POTV) (BLITVICH, *et al.* 2012).

Assim, dentre os arbovírus estão os vírus da família *Bunyaviridae*, que são os únicos cujo espectro de hospedeiros inclui invertebrados, vertebrados e plantas. 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 incluindo mais de 350 isolados, dividida em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*, compreendendo mais da metade dos arbovírus. 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 *et al.*, 2005; OVERBY *et al.*, 2008; WALTER & BARR, 2011; GUU *et al.*, 2012).

A maioria dos *bunyavírus* é difundida na natureza por ciclos de transmissão silvestres entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos, incluindo mosquitos, flebótomos, carrapatos e maruins. O vírus Bunyamwera (BUNV) 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). Além disso, 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 sequências nas extremidades são altamente conservadas entre os vírus do mesmo gênero, mas diferem daquela de outros gêneros. Cada um dos segmentos de RNA encontra-se envolvido por nucleoproteínas, denominadas proteínas N, que em associação com a polimerase, proteína L, constituem os ribonucleocapsídeos (FIGURA 3) (BISHOP *et al.*, 1980; ELLIOTT, 1990; GRIOT *et al.*, 1993; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2007; OVERBY *et al.*, 2008; WALTER & BARR, 2011, GUU *et al.*, 2012).

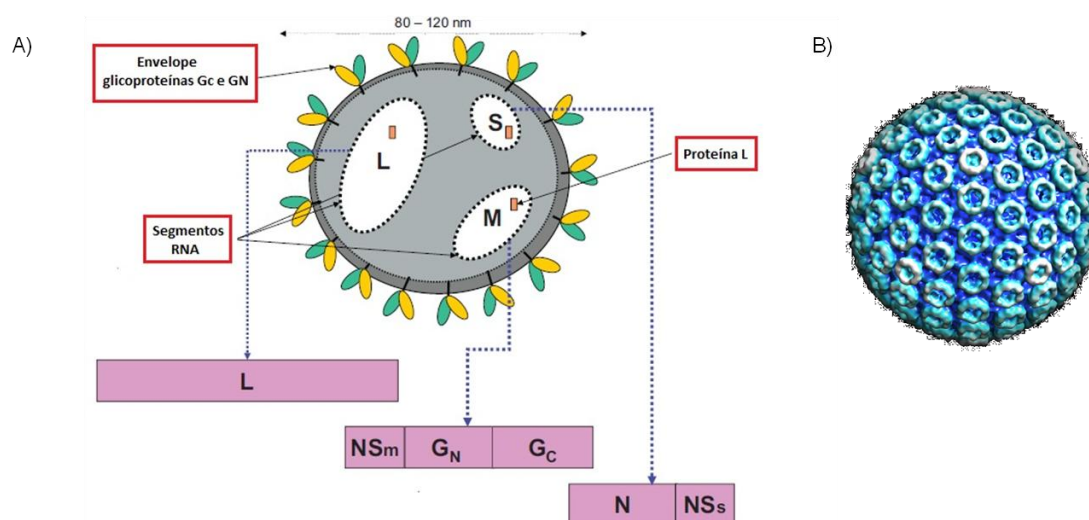


Figura 3 – Partícula viral característica da família *Bunyviridae*. A) Os três segmentos genômicos (S, M e L) estão complexados com a proteína N para formar os nucleocapsídeos. O nucleocapsídeo e a polimerase viral estão empacotados dentro de um envelope lipídico contendo as glicoproteínas Gn e Gc. Segmento 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. B) Rift valley fever virus particle.

Fonte: adaptado de PEPIN *et al.* 2010; METZ & PIJLMAN, 2011.

Os membros da família *Bunyviridae* não codificam uma matriz proteica, 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) (WEBER *et al.*, 2002b; SALANUEVA *et al.*, 2003;

GONZALEZ-SCARANO *et al.*, 2005; KOHL *et al.*, 2006; SCHMALJOHN & NICHOL, 2007 ; WALTER & BARR, 2011).

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; WALTER & BARR, 2011).

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; WALTER & BARR, 2011).

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; WALTER & BARR, 2011).

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).

A proteína NSs apresenta grande variabilidade com relação ao seu tamanho e seqüência de aminoácidos para os membros da família *Bunyaviridae*. A construção de vírus mutantes, deficientes para esta proteína, indica que ela não é essencial para a replicação viral tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo designada como uma proteína acessória, que atua como um fator de virulência para interromper a síntese proteica do hospedeiro, e assim inibir a síntese de IFN (BRIDGEN *et al.*, 2000; LEONARD *et al.*, 2006).

A proteína NSs do vírus Rift Valley Fever (RVFV) suprime o sistema imune inato do hospedeiro, bloqueando a produção de IFN- α/β em células infectadas (WEBER *et al.*, 2002a; BILLECOCQ *et al.*, 2004; LEONARD *et al.*, 2006). Blakqori e colaboradores em 2007 confirmam estas hipóteses citadas utilizando como modelo o vírus La Crosse (LACV) selvagem e um vírus mutante deletado

para a proteína NSs. Os autores mostraram que, tanto em células como em animais infectados, a síntese de IFN tipo I é fortemente inibida, demonstrando que a NSs do LACV suprime a indução de IFN.

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, exceto para os hantavírus (SONG *et al.*, 2005; SCHMALJOHN & NICHOL, 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 sequência truncada de aproximadamente 100 nucleotídeos que acredita-se serem terminações transcricionais (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

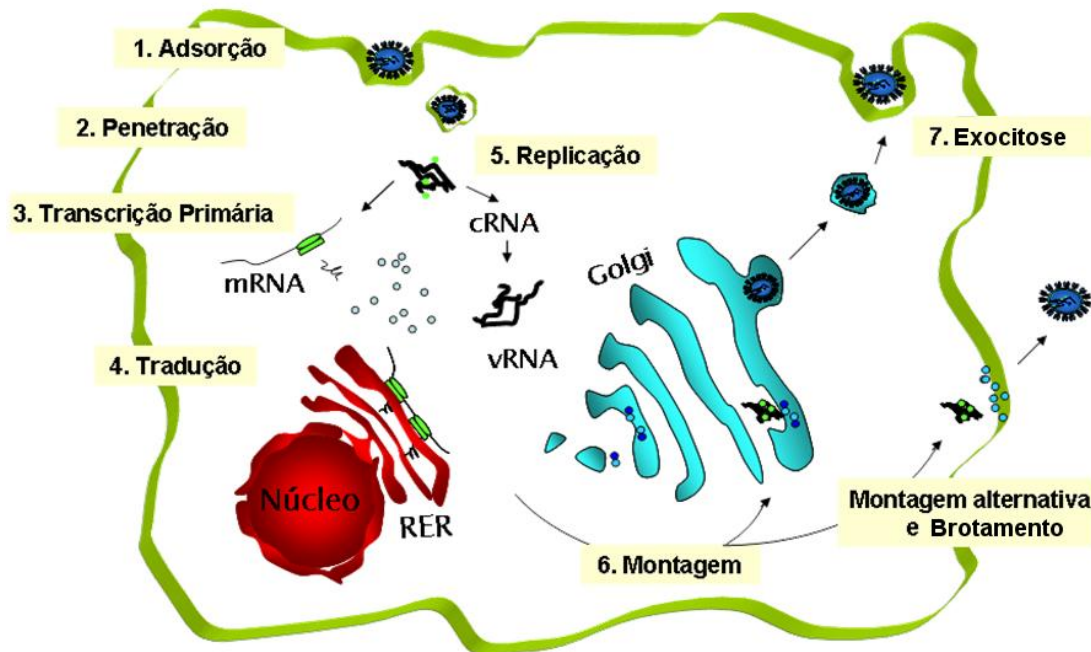


FIGURA 4 - Ciclo de multiplicação dos vírus da família *Bunyaviridae*. 1- Adsorção das partículas virais à superfície da célula; 2- Penetração por endocitose seguida por fusão de membrana, permitindo a liberação no citoplasma dos nucleocapsídeos e da polimerase viral; 3- Transcrição primária; 4- Tradução 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: Reticulo endoplasmático. Alguns vírus da família utilizam uma montagem alternativa, brotando diretamente da membrana plasmática. Fonte: adaptado de SCHMALJOHN *et al.*, 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 ocorrem 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 (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

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).

1.2.3 – Patogenia, manifestações clínicas e tratamento

Muitos bunyavírus são importantes patógenos humanos e animais o que os torna um grande problema de saúde pública. Assim, 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).

As pessoas que mantêm contato mais estreito com o ambiente silvestre, no qual se situam os nichos ecológicos de tais vírus, são atingidas com maior frequência. Entretanto, muitas destas doenças 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 vírus 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 (ROSA *et al.*, 1997). Como exemplo podemos citar o vírus da Febre Hemorrágica de Crimean-Congo (CCHFV) que é o segundo maior vírus a provocar doença no homem, ficando atrás apenas do vírus da Dengue (DENV), sendo endêmico na África, Ásia e Europa e o vírus da febre de Rift Valley (RVFV) que causa encefalite (HOLLIDGE *et al.*, 2010).

O mecanismo que origina as manifestações clínicas e as alterações patológicas da maioria das arboviroses ainda não é suficientemente conhecido. Porém estudos experimentais demonstram que, os arbovírus após a transmissão pelo inseto ao hospedeiro, se multiplicam no local da porta de entrada e, por via linfática, alcançam o linfonodo regional, onde sofrem nova replicação. Pelos vasos linfáticos eferentes chegam ao ducto torácico e à corrente sanguínea. Na corrente sanguínea realizam viremia (primária), e a partir desta se espalham pelos tecidos alvo, infectando preferencialmente as células endoteliais e as dos músculos estriados, que servem de fonte para um fluxo contínuo de vírus para a corrente sanguínea (viremia secundária que corresponde ao período febril), e daí, dependendo do tropismo viral se distribuem pelo organismo podendo alcançar, inclusive o sistema nervoso central (FIGURA 5). 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 (ROSA *et al.*, 1997; AZEVEDO *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2010).

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 inóculo, tempo

de exposição aos transmissores, a amostra do vírus e os fatores do hospedeiro. (BEATY *et al.*, 1995; GUBLER, 2002; ROSA *et al.*, 1997; MELLOR, 2000; NALCA *et al.*, 2003).

Os arbovírus do grupo C determinam no homem, um quadro de doença febril aguda, cujo início geralmente é súbito. A febre pode ser alta, chegando a ultrapassar 40° C, e persiste por 4-5 dias. Os pacientes usualmente queixam-se de cefaleia, mal-estar, calafrios, bem como de dores musculares e articulares. Outras manifestações clínicas incluem vertigem, náusea, anorexia e fotofobia. Os sintomas podem ser intensos, chegando a causar prostração. Os enfermos usualmente apresentam fraqueza capaz de persistir por várias semanas após o desaparecimento dos sintomas da fase aguda. Nenhuma alteração neurológica foi observada nos pacientes (CAUSEY *et al.* 1961; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; FIGUEIREDO, 1999; De Brito Magalhães *et al.* 2011).

Não há tratamento específico para as arboviroses. O tratamento visa apenas a 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).

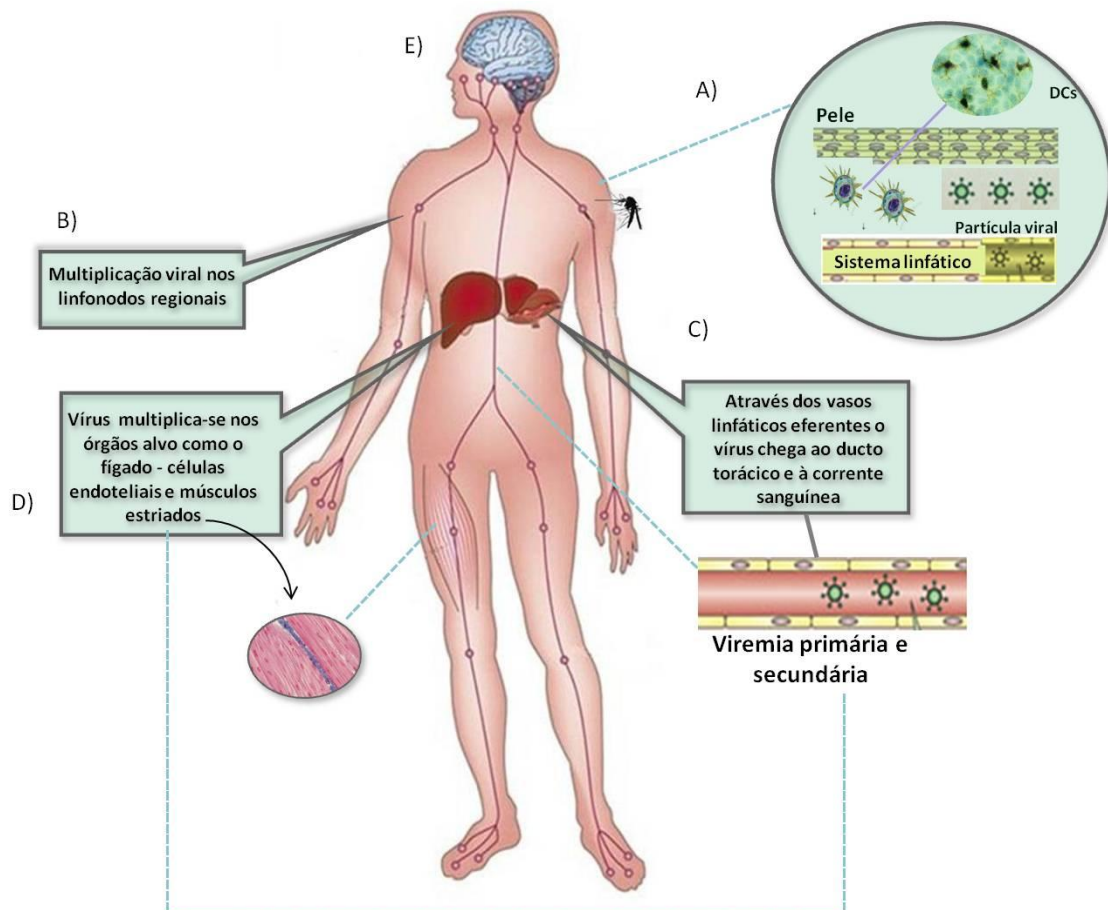


Figura 5 – Disseminação dos arbovírus em vertebrados. Transmissão dos arbovírus ocorre após a picada de um artrópode hematofago A – o vírus então se multiplica principalmente nas células dendríticas da pele e através do sistema linfático B – alcança os linfonodos regionais onde sofre nova multiplicação C – agora através dos vasos linfáticos eferentes o vírus chega ao ducto torácico e à corrente sanguínea (viremia primária) D –o vírus espalha-se portanto pela corrente sanguínea e ocorre a infecção dos órgãos alvo como o fígado por exemplo e os músculos estriados, que servem de fonte para um fluxo contínuo de vírus para a corrente sanguínea (viremia secundária) que corresponde ao período febril E – e, dependendo do tropismo viral este por sua vez se distribui pelo organismo podendo alcançar, inclusive o sistema nervoso central.

1.3 - Gênero *Orthobunyavirus*

O gênero *Orthobunyavirus* é o maior dentro da família *Bunyaviridae*, incluindo 48 espécies e 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 19 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), e um décimo nono grupo já foi adicionado (AQUINO *et al.*, 2002; YANASE *et al.*, 2003; WEIDMANN *et al.*, 2003, De Brito Magalhães *et al.* 2011; CHOWDHARY *et al.*, 2012). Os sorogrupos Califórnia, Bunyamwera e Simbu possuem como membros importantes patógenos humanos como os vírus La Crosse, Ngari e Oropouche (LE MAY & BOULOY, 2012).

Tabela 1 - *Orthobunyavirus*: sorogrupos e alguns exemplares.

Gênero	Sorogrupo	Exemplos
<u><i>Orthobunyavirus</i></u>	Anopheles A	vírus Trombetas
	Anopheles B	vírus Boracéia
	Bakau	vírus Nola
	Bunyamwera	vírus Bunyawera
	Bwamba	vírus Buwamba
	C	vírus Caraparu, Itaqui, Oriboca,
	California	vírus La Crosse, Tahyna, Melão
	Capim	vírus Capim
	Gamboia	vírus Gamboia, Pueblo Viejo
	Guama	vírus Guama, Ananindeua
	Koongol	vírus Koongol, Wongal
	Minatitlan	vírus Palestina
	Nyando	vírus Nyando
	Olifantsvlei	vírus Bobia
	Patois	vírus Patois, Babahoya
	Simbu	vírus Simbu, Oropouche
	Tete	vírus Tete
	Turlock	vírus Umbre
Wyeomyia	vírus Sororoca	

Fonte: http://ictvdb.bio-mirror.cn/lctv/fs_bunya.htm

Os ensaios sorológicos como inibição de hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e neutralização (NT) sempre foram amplamente utilizados no diagnóstico de infecções pelos *Orthobunyavirus* (De Brito Magalhães *et al.* 2011). O método de FC é mais específico que o da IH 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).

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 orthobunyavírus 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).

Todos os vírus do sorogrupo C, que foram isolados durante estudos realizados nessa região são conhecidos por causar doenças febris em humanos. E apesar de terem sido isolados há 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 (ROSA *et al.*, 1997).

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. Hoje, sabe-se que o vírus Tacaiuma pertence ao sorogrupo *Anopheles A* (CAUSEY *et al.*, 1961; FIGUEIREDO, 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 Itaqui, 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 Trinidad, 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, Itaqui, Madrid, Marituba, Murucutu, Oriboca, Ossa, Restan, Gumbo-Limbo, Nepuyo,

Vinces, Bruconha e 63U11 (NUNES *et al.*, 2005). Estes foram isolados de humanos, mosquitos, roedores, marsupiais e morcegos e, são divididos em quatro complexos antigênicos: Caraparu, Madrid, Marituba e Oriboca (TABELA 2). Além disso tais vírus estão entre os primeiros vírus descritos em estudos realizados na Amazônia brasileira na década de cinquenta e, apesar de serem vírus de importância para a saúde pública, pouco é conhecido sobre as características moleculares e genéticas das amostras de vírus do grupo C que circulam no Brasil (De Brito Magalhães *et al.* 2011).

Tabela 2 – Classificação sorológica dos vírus do grupo C e seus complexos antigênicos de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) (2005).

Complexo antigênico	Vírus isolados
vírus Caraparu	vírus Caraparu BeAn3994 (CARV) vírus Bruconha (BRUV) vírus Apeu BeAn849 (APEUV) vírus Ossa BT 1820 (OSSAV) vírus Vinces 75V-807 (VINV)
vírus Madrid	vírus Madrid BT 4075 (MADV)
vírus Marituba	vírus Marituba BeAn15 (MTBV) vírus Gumbo limbo BeAn3994 (GLV) vírus Marituba 63U-11 (MTBV) vírus Murutucu (MURV) vírus Nepuyo (NEPV) vírus Restan (RESV)
vírus Oriboca	vírus Oriboca BeAn17 (ORIV) Vírus Itaqi BeAn17 (ITQV)

Fonte: http://ictvdb.bio-mirror.cn/ictv/fs_bunya.htm

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. Este vírus foi isolado pela primeira vez, na floresta de Utinga, próxima à floresta de Oriboca (FIGURA 6 e 7), do soro de macacos *Cebus apella* e posteriormente de um caso clínico (do qual recebeu seu nome) e também de mosquitos (CAUSEY *et al.*, 1961). O vírus Caraparu (CARAV) foi também isolado de um caso clínico de

um paciente da região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo na década de 80 (IVERSSON *et al.* 1987).

O vírus Oriboca (ORIV) 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 6 e 7). Nos anos que se seguiram a estes estudos iniciados por Shope, o ORIV foi isolado de diversos outros trabalhadores naquela área. Foram encontrados soros positivos para este vírus em 25,5% aproximadamente dos indivíduos testados. Os pacientes apresentavam febre alta, dores musculares, náuseas, vertigens e fotofobia. Apeu, Caraparu, Marituba, Murutucu e Oriboca corresponderam juntos a aproximadamente 50% do número total de isolados obtidos, deixando evidente a intensa circulação desses vírus na região estudada (CAUSEY *et al.*, 1961; ROSATO *et al.*, 1974).

O vírus Itaqui (ITQV) (BeAn 12797) foi posteriormente isolado também na região da floresta de Oriboca, próximo a uma pedreira chamada Itaqui no ano de 1956 de macaco sentinela (FIGURA 6 e 7). Desde essa data, o ITQV foi isolado de diversos trabalhadores, camundongos, sentinelas e animais selvagens durante estudos no norte do Brasil (SHOPE, 1961).

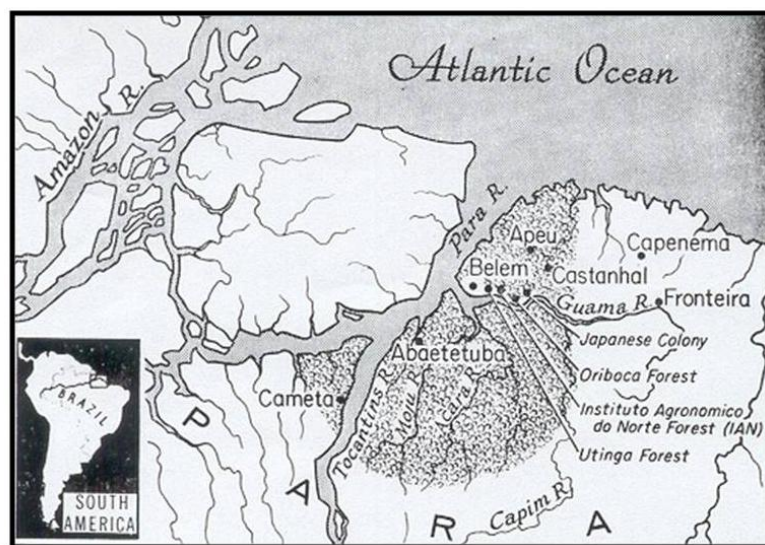


Figura 6 – Mapa da localização da área do estado do Pará estudado nos anos de 1954 a 1959, na qual foram isoladas as 451 amostras de arbovírus. Fonte: CAUSEY *et al.*, 1961.



Figura 7 – A) fotografia mostrando cenário dos primeiros isolamentos virais a partir de um macaco sentinela na floresta de Oriboca B) os macacos sentinelas eram alimentados diariamente e deles eram extraído sangue para a inoculação em camundongos. Fonte: <http://www.iec.pa.gov.br>.

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 FC, os grupos com maior identidade eram: Murutucu/Oriboca, Itaquí/Caraparu e Marituba/Apeu. Já nas provas de IH e NT, os grupos afins eram Oriboca/Itaquí, Apeu/Caraparu e Marituba/Murutucu (FIGURA 8) (SHOPE *et al.*, 1962).

Cabe citar que, as reações de IH e NT refletem as propriedades das glicoproteínas Gc e Gn codificadas pelo segmento M desses vírus. Já a reação de FC reflete as propriedades da proteína N, codificada pelo segmento S, ou seja, tais provas refletem a identidade do genoma desses vírus em relação aos segmentos M e S (NUNES *et al.*, 2005).

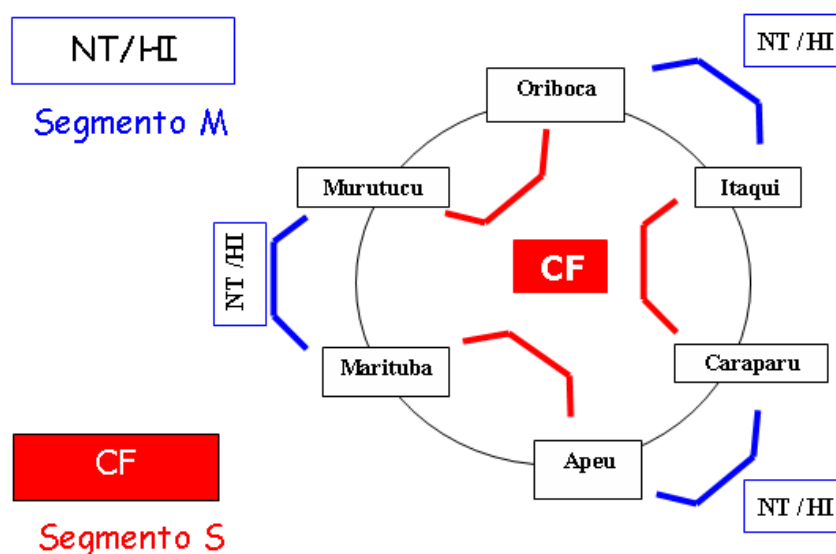


Figura 8 – Relações sorológicas entre os vírus do grupo C: Apeu, Caraparu, Itaqui, Marituba, Murucutu e Oriboca.

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

O diagnóstico das infecções pelos *Orthobunyavirus* do grupo C consiste, até hoje, dos resultados obtidos dos três testes sorológicos (FC, IH, 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).

Diversos trabalhos vêm sendo conduzidos no Laboratório de Vírus - ICB/UFMG desde a década de 70, para a caracterização dos *Orthobunyavirus* do Grupo C para um melhor entendimento e compreensão da filogenia, evolução e

patogênese destes vírus. Nesta época, foram conduzidos estudos sobre a morfologia das partículas dos vírus do grupo C em células VERO infectadas. Alguns dos resultados podem ser vistos na FIGURA 9.

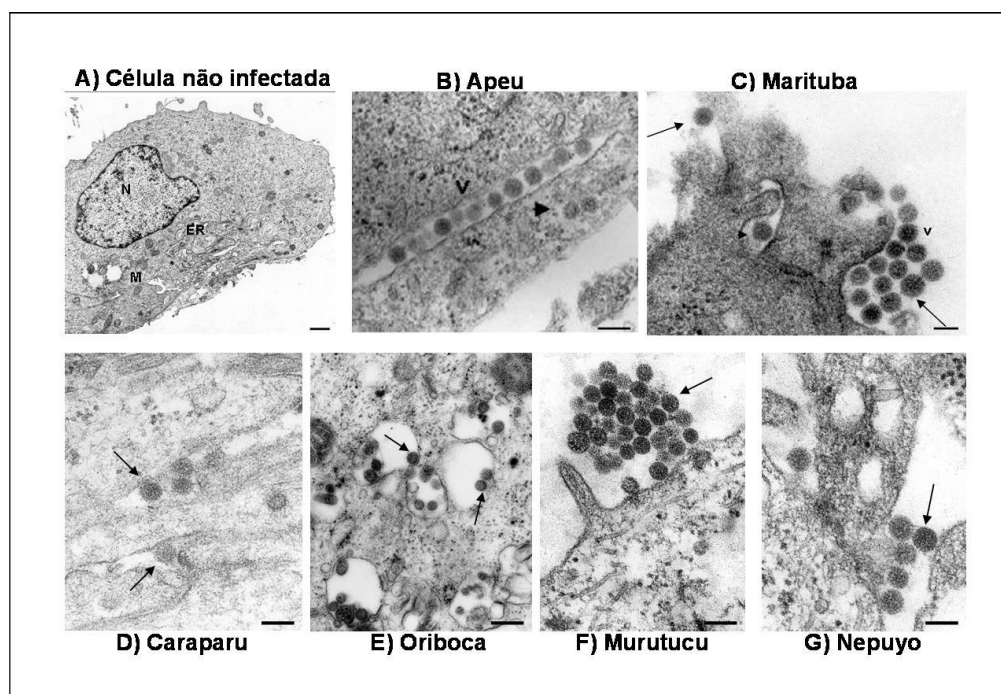


Figura 9 – Análise ultraestrutural dos vírus do grupo C. Células VERO foram infectadas com os diferentes vírus e a análise por microscopia eletrônica foi feita 18 horas após infecção. (A) Células controle não infectadas mostrando citoplasma, retículo endoplasmático (ER), núcleo (N) e mitocôndria (M). (B) Vírus Apeu. (C) Vírus Marituba. (D) Vírus Caraparu. (E) Vírus Oriboca. (F) Vírus Murutucu. (G) Vírus Nepuyo. Setas indicam as partículas de vírus. Barras: 1 µm (A); 200 nm (B, C, D, F e G); 100 nm (E). Fonte: Ferreira P.C.P. & Kitajima E.W (dados não publicados).

Novaes em 2006 caracterizou por amplificação molecular do genoma alguns membros do Grupo C, obtendo sequências parciais para os segmentos S e M dos vírus Apeu e Marituba com resultados surpreendentes.

Os 247 pb do segmento S do vírus Apeu mostrou 100% de homologia com o vírus Bunyamwera, resultado este diferente daquele obtido por Magalhães em 2008, onde o segmento S após sequenciamento e construção da árvore filogenética agrupou o APEUV com os membros dos sorogrupos Califórnia e Bwamba. Já o amplificado correspondente a uma porção do segmento M (~380 pb) deste mesmo vírus, agrupou essa amostra com os demais vírus do grupo C provenientes do IEC e recentemente caracterizados por Nunes e colaboradores

em 2005. Esse fato levantou a hipótese de um rearranjo entre os vírus Bunyamwera e o vírus Apeu, pois obstante este é um evento comum entre os membros da família *Bunyaviridae*.

Os dados do sequenciamento parcial também do segmento S para o vírus Marituba mostrou que, este é um variante do vírus Thayna (TAHV), membro do sorogrupo Califórnia Encephalites e, portanto não se integram ao sorogrupo C, contradizendo os resultados provenientes do IEC. Tal fato poderia ser explicado por duas hipóteses: contaminação das amostras do grupo C pelo vírus TAHV ou, a possibilidade de que o isolamento desses vírus na década de cinquenta durante os estudos realizados por Shope tenha sido feita concomitantemente com o vírus TAHV. Cabe ressaltar que, frequentemente, durante os estudos para o isolamento dos arbovírus conduzidos por Shope, foram detectados dois ou mais vírus em uma mesma amostra e ainda que, o vírus TAHV foi isolado pela primeira vez na antiga URSS no ano de 1958, sendo sua caracterização realizada somente na década seguinte. A primeira hipótese levantada de contaminação dessa amostra foi afastada, uma vez que o Laboratório de Vírus do ICB não dispõe de amostras do vírus TAHV. Quinan em 2007 e Magalhães em 2008 confirmaram esta hipótese levantada por Novaes em 2006.

A caracterização molecular de amostras virais do Grupo C (Apeu, Caraparu e Marituba) também foi feita por Magalhães em 2008 e os dados publicados. As seqüências obtidas foram condizentes parcialmente com os do IEC. O APEUV foi caracterizado através do seqüenciamento e análise filogenética dos três segmentos genômicos S, M e L sendo esta amostra uma variante genética contendo o segmento S rearranjado, não sendo possível identificar o vírus com o qual tal amostra sofreu rearranjo (De Brito Magalhães *et al.* 2011).

Em relação ao CARV, os estudos de caracterização molecular foram feitos através do seqüenciamento e análise filogenética dos segmentos M e L. A análise filogenética para o segmento M agrupou tal amostra no gênero *Orthobunyavirus*, em um clado diferente dos demais sorogrupos o que confirmou que esse vírus pertence a um sorogrupo distinto. Já a região

sequenciada do segmento L agrupou o CARV juntamente aos vírus do gênero *Orthobunyavirus*, confirmando sua classificação sorológica.

Assim todos os estudos realizados até o momento, envolvendo os *Orthobunyavirus* do Grupo C, visaram uma maior compreensão de suas propriedades biológicas, moleculares, morfológicas e sorológicas. Os primeiros estudos conduzidos com tais vírus, no Laboratório de Vírus ICB – UFMG durante os anos setenta foram realizados na tentativa de correlacioná-los com a principal proteína de defesa antiviral do hospedeiro, o interferon (IFN). Tais estudos mostraram que, a multiplicação de diversos bunyavírus em cultura de tecido pode ser inibida pelo tratamento com diversos tipos de IFN (MEZÊNCIO *et al.*, 1978; PETRILLO-PEIXOTO, 1980; MAGALHÃES, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2008; ASSIS, 2008).

1.4 – Modelos experimentais para os *Bunyavirus*

O desenvolvimento de modelos experimentais para estudar os mecanismos de replicação dos arbovírus, importantes patógenos de humanos e animais, poderá revelar como estes vírus de RNA surgem para causar surtos e epidemias (WEAVER & BARRETT, 2004). Tais modelos podem ainda serem usados, para o entendimento da patogenia, o que se torna relevante para as infecções humanas e para o desenvolvimento e teste de vacinas, bem como para propor novas estratégias terapêuticas.

Camundongos e hamsters têm sido utilizados de maneira sistemática como modelos experimentais para o estudo dos arbovírus. Estudos experimentais utilizando-se camundongos inoculados com o vírus Punta Toro, por via subcutânea, demonstraram o aparecimento de necrose hepatocelular extensa, e morte dos animais em quatro dias, quando foram utilizados camundongos com menos de cinco dias de vida; no entanto quando foram utilizados camundongos com oito semanas de vida os autores verificaram que, aproximadamente 95% desses animais se recuperaram e atribuíram tal fato

devido à presença de interferon no organismo dos animais (Pifat & Smith, 1987).

A infecção experimental pelos arbovírus do grupo C pode se manifestar por viremia, desenvolvimento de anticorpos, doença e morte dos animais (PEIXOTO, 1977). Estudos demonstraram que, o APEUV quando inoculados em ratos lactentes (*Mus musculus albinus*), estes foram mais susceptíveis à infecção intracerebral em relação aos animais adultos. Nos lactentes, foi observado o aparecimento de enfermidade e morte (100%), enquanto que nem todos os ratos adultos apresentaram sinais de doença. As alterações histopatológicas mais características no fígado foram áreas de necrose e infiltrado inflamatório. Os ratos adultos suportaram a infecção viral e responderam imunologicamente com a produção de Ac específicos, dada sua maior resistência (MUCHA-MACÍAS et al., 1969).

Brinton e colaboradores em 1993 caracterizaram um modelo de uma rápida doença periférica inoculando o CARAV em camundongos de 4-6 semanas. Os animais desenvolveram uma necrose hepática e morreram 4-6 dias depois de terem sido inoculados intraperitoneal. Também Deardorff e colaboradores em 2010 estabeleceu uma infecção com os vírus da VEEV e o vírus Nepuyo em camundongos selvagens (*Oryzomys couesi*). Os animais sobreviveram à infecção e desenvolveram viremia sem sinais clínicos de doença aparentes com produção de anticorpos.

Poucos membros da família *Bunyaviridae* são estudados em animais experimentais, principalmente porque importantes patógenos tais como o RVFV, Hantavírus e CCHFV requerem laboratórios de contenção especiais (WEBER et al., 2002b).

Ainda no Laboratório de Vírus, Magalhães em 2004 demonstrou que, a infecção de camundongos neonatos via intracerebral com 100 unidades formadoras de placas (UFP) do vírus Apeu, Caraparu e Itaqui causou a morte de 100% dos animais, sendo o maior tempo de sobrevivência (92 h) observado

naqueles infectados com o vírus Itaquí. Adicionalmente, os vírus foram detectados no fígado, cérebro e baço dos animais infectados. Em 2008 a mesma autora demonstrou que a susceptibilidade de camundongos à infecção pelo vírus Apeu foi idade-dependente, destacando-se a importância do sistema imune inato e adaptativo frente à infecção.

1.5 – A imunidade inata e os bunyavírus

Em muitos casos, após a infecção de um vertebrado por um bunyavírus através de picadas, pelos mosquitos ou ainda carrapatos, ocorre a inoculação do vírus na pele, tornando as células dendríticas (DCs) tais como as células de Langerhans, os principais alvos. Estas células, agora infectadas, por via linfática alcançam o linfonodo regional o que permitirá ao vírus entrar na corrente sanguínea e assim se disseminar. Após a entrada do vírus a primeira resposta do hospedeiro é uma reação inflamatória incluindo a secreção de mediadores solúveis tais como citocinas e quimiocinas. Entre esses mediadores, os interferons, especialmente os do tipo I (α/β) estão entre os mais eficientes em montar uma rápida resposta no hospedeiro com o objetivo de bloquear a replicação viral (LE MAY & BOULOY, 2012).

1.5.1 – Interferons

Os IFN 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 IFN possuem também importantes funções imunomodulatórias e atividades fisiológicas (ALMEIDA *et al.*, 2008; SADLER *et al.*, 2008; CARLTON-SMITH & ELLIOTT, 2012; LAZEAR, *et al.* 2013).

Os IFN 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 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 IFN do tipo I respectivamente (FIGURA 10) (ANK *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2008; BONJARDIM, 2008; KATZE *et al.*, 2008; CARLTON-SMITH & ELLIOTT, 2012; LE MAY & BOULOY, 2012; LAZEAR, *et al.* 2013).

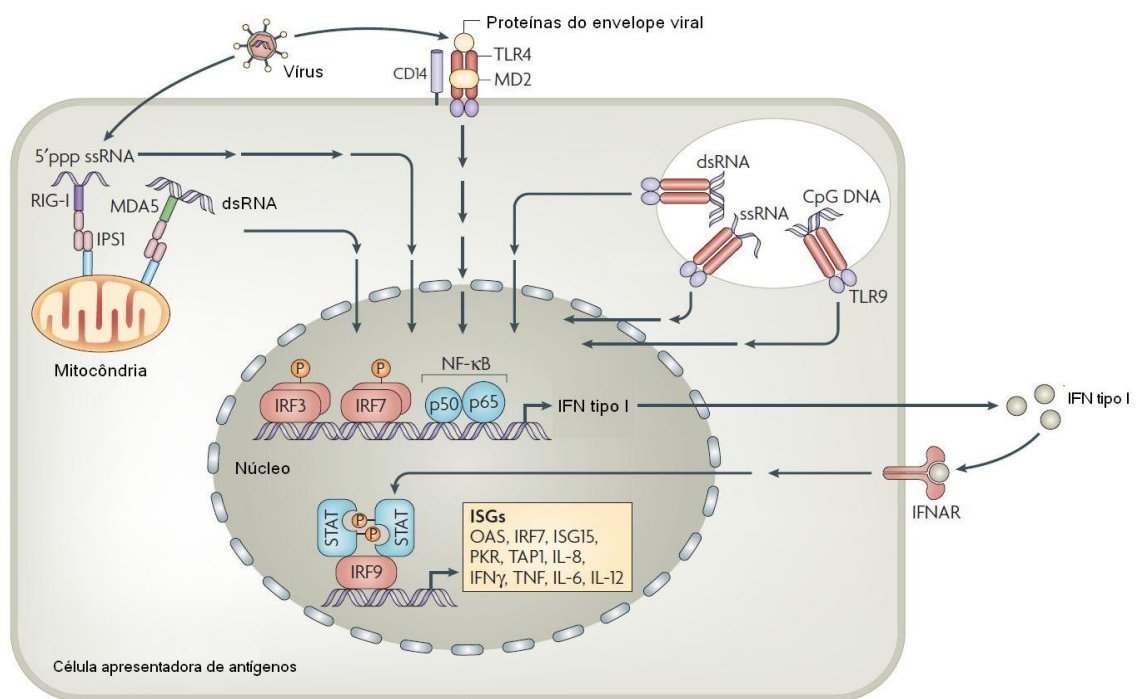


Figura 10 – Representação esquemática da estimulação da expressão dos ISGs e iniciação da atividade antiviral desencadeada pelos IFN. As proteínas virais e ácidos nucléicos (PAMPs) são reconhecidos pelos PRRs celulares (TLRs 3,7,8,9 MDA5 ou RIG1). A interação PRR-PAMP desencadeia uma cascata de sinalização que regulam a transcrição dos ISGs e também de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Fonte: adaptado de KATZE *et al.*, 2008.

As atividades biológicas dos IFN 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 (BONJARDIM *et al.*, 2008). Para isto, os IFN 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 (Jaks) ou tirosinas quinases (Tyks). Estas quinases ativadas, fosforilam transdutores de sinais e ativadores da transcrição (STAT), que vão para o núcleo e se ligam a seqüências específicas DNA presente nos promotores dos ISGs (FIGURA 11) (SEN, 2001, UZÉ, 2007, BONJARDIM, 2008; SADLER *et al.*, 2008; CARLTON-SMITH & ELLIOTT, 2012; LE MAY & BOULOY, 2012; LAZEAR, *et al.* 2013).

Os mais bem caracterizados fatores antivirais induzidos pelos IFN até o momento são a proteína quinase R (PKR), o sistema 2'-5' oligoadenilato sintetase/RNase L e as proteínas Mx. Estes fatores citados 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; LE MAY & BOULOY, 2012). O gene PKR é uma proteína quinase que é ativada após se ligar à RNA de dupla fita viral (um subproduto da atividade da RNA polimerase viral), o que resulta em um bloqueio do sistema de tradução do hospedeiro, limitando a replicação viral. Como o PKR, também o gene 2'-5' OAS é ativado após ligação ao RNA de dupla fita para que sua atividade enzimática ocorra que irá clivar RNA celular e viral bloqueando assim a replicação do vírus. Assim ambos os genes interrompem a síntese protéica celular (GÁRCIA-SASTRE, 2011). 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).

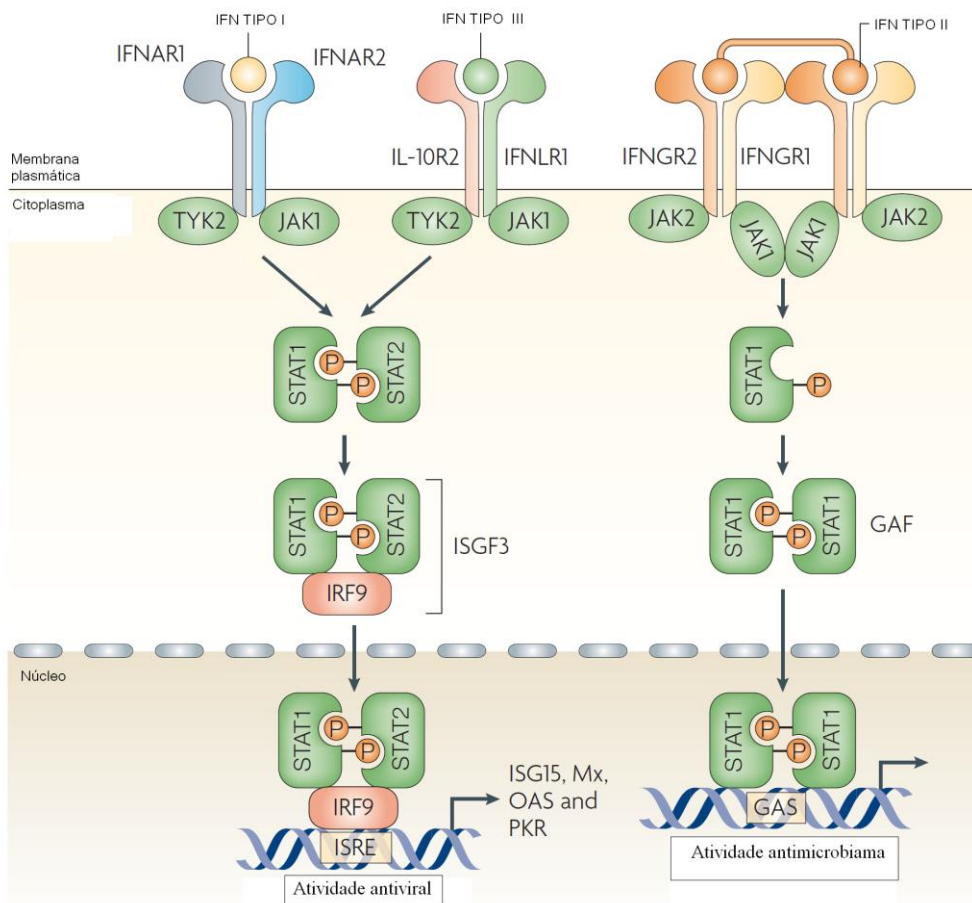


Figura 11 – Representação esquemática da via de sinalização dos IFN através de seus receptores celulares. A ação dos interferons é mediada através de seus receptores celulares que ativam fatores da transcrição que se deslocam para o núcleo para induzir os ISGs através do promotor ISREs (elementos responsivos estimulados por IFN) para os IFN tipo I e III ou GAS para o IFN tipo II. Fonte: adaptado de SADLER *et al.*, 2008.

Já as proteínas MxA compreendem uma pequena família de GTPases, proteínas envolvidas no tráfego de vesículas intracelulares e homeostase de organelas. (HALLER *et al.*, 2007). A proteína humana MxA é induzida exclusivamente pelos IFN- α/β e parcialmente associada com as membranas do retículo endoplasmático liso e está envolvida na inibição da entrada do material genético viral no núcleo da célula hospedeira. MxA é um componente chave da defesa antiviral induzida por IFN contra vírus de diversas famílias tais como *Bunyviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Picornaviridae* e *Hepadnaviridae* (ANDERSSON *et al.*, 2004; GÁRCIA-SASTRE, 2011).

Os IFN são divididos em três grupos de acordo com o complexo receptor pelos quais eles sinalizam: o tipo I (chamados IFN alfa, beta, delta, épsilon, kappa, ômega e tau), o tipo II (IFN gama) e o tipo III descobertos recentemente (chamados IFN 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).

1.5.2 – 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 dos IFN tipo I 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, OLIVEIRA *et al.*, 2011). 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 IFN, sugerindo que podem estar agrupados em áreas específicas da membrana celular (KIM *et al.*, 1997). Os genes que codificam os IFN 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, e também fibroblastos respectivamente, sendo as principais citocinas do sistema imune inato. Sua indução é controlada a níveis transcricionais (GOODBOURN *et al.*, 2000; TANIGUCHI *et al.*, 2001; VILCEK, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2008). A atividade antiviral dos IFN tipo I ocorre através da ativação dos ISGs e modulação do sistema imune inato (FIGURA 11).

Os IFN tipo I combatem os vírus diretamente por inibirem sua multiplicação nas células e, indiretamente por estimular as respostas imunes inata e adaptativa. 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 *et al.*, 2006).

O IFN tipo II 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). O IFN- γ é produzido principalmente por linfócitos T e células “Natural Killer” (NK) após 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 IFN do tipo I, também possui atividade antiviral e antiproliferativa (SEN, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2008; BONJARDIM, 2008). O gene que codifica o IFN- γ está localizado no cromossomo doze humano (VILCEK, 2003).

Os IFN 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 (Jak-STAT) (FIGURA 11) (VILCEK, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2008).

Os IFN 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 IFN do tipo I (KOTENKO *et al.*, 2003; SHEPPARD *et al.*, 2003; SOMMEREYNS *et al.*, 2008; BONJARDIM, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2008). Estes são representados por três genes com introns, no cromossomo 19 humano e tal como os IFN do tipo I, também são expressos pelas células mononucleares periféricas do sangue e células dendríticas depois de uma infecção por vírus ou presença de RNA dupla-fita (KOTENKO *et al.*, 2003 ; SHEPPARD *et al.*, 2003; MEAGER *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2008).

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

Os IFN tipo III exibem atividade antiviral, porém são estruturalmente e geneticamente distintos dos IFN 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 IFN 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; FRIBORG *et al.*, 2013).

O receptor celular para os IFN 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. Consequentemente, a proteção antiviral pelos IFN do tipo I é observada na maioria dos tipos celulares, enquanto a proteção mediada pelos IFN- 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 IFN do tipo III mostrou ser dependente dos mesmos estímulos (infecção viral e TLRs) e vias de transdução de sinal similares às utilizadas pelos IFN tipo I, apesar dos receptores celulares serem diferentes. As respostas desencadeadas por estas duas classes de IFN também são similares, levando à ativação de STAT-1 e STAT-2 resultando na transcrição dos conhecidos ISGs (FIGURA 11) (VILCEK, 2003; SOMMEREYNS *et al.*, 2008; MORDSTEIN, 2008; FRIBORG *et al.*, 2013).

1.5.3 – Mecanismo de escape ao sistema imune pelos buyavirus

A montagem de uma efetiva resposta antiviral depende não somente da estimulação da produção de IFN tipo I, que impedirá a replicação viral, mas também da atração de células inflamatórias para o sítio da infecção o qual previne a disseminação dos vírus. Todas essas ações são bem coordenadas e os vírus concentram suas estratégias de evasão ao sistema imune, contra moléculas chave que desempenham um importante papel na resposta antiviral como os IFN. (BONJARDIM *et al.*, 2008). Assim, em resposta às ações dos IFN, cada vírus desenvolve estratégias específicas, para contra-atacar tais mecanismos de defesa do hospedeiro (LE MAY & BOULOY, 2012).

Os vírus podem bloquear quase todos os aspectos da via de regulação dos IFN, o que inclui a degradação do intermediário replicativo RNA dupla-fita, a degradação dos receptores de IFN, a inibição da via de sinalização JAK-STAT, a inibição de IRF e NF- κ B e outros processos tais como as ações antivirais específicas dos ISGs (KATZE *et al.*, 2002).

Através da evolução, estes agentes vêm desenvolvendo todas essas estratégias para evadirem das respostas imunes e usar as proteínas do hospedeiro para seu próprio ciclo de multiplicação. Ainda, os efeitos dos vírus sobre o sistema de defesa do hospedeiro podem afetar a detecção viral pelos PRRs permitindo assim a manipulação das vias de sinalização do hospedeiro em seu próprio benefício (BOWIE & UNTERHOLZNER, 2008).

A proteína VP35 do vírus Ebola é um exemplo de proteína que interfere com a sinalização dos PRRs, esta seqüestra o RNA fita-dupla viral e também inibe a ativação de IRF3 (BOWIE & UNTERHOLZNER, 2008). Já a proteína NS1 do vírus Influenza é um antagonista da via RIG-1 (gene induzido por ácido retinóico) que está envolvido com o reconhecimento de PAMPs especialmente RNA fita-dupla viral. Através da interação de NS1/RIG-1 ocorre o bloqueio da ativação de IRF3 e expressão de IFN- β . O vírus Vaccinia (VACV) codifica duas

proteínas (A46 e A52) que têm como alvo distintos componentes da via de TLR antagonizando assim respostas antivirais do hospedeiro (BONJARDIM *et al.*, 2008).

A elucidação desses mecanismos usados pelos vírus para inibir ou manipular as respostas do hospedeiro é importante para o nosso entendimento sobre a patogênese viral, sobretudo com relação aos vírus RNA. Tais vírus sofrem mutações rapidamente, e a detecção dessas mutações que podem aumentar ou diminuir a atividade das proteínas virais que interferem com as respostas imunes do hospedeiro, irão ajudar a definir os diversos fatores de virulência de diferentes espécies virais que infectam humanos (BOWIE & UNTERHOLZNER, 2008).

Neste contexto, os membros da família *Bunyaviridae* possuem grande potencial de escaparem do sistema imune por manterem uma alta variabilidade, usando os mecanismos chamados “antigenic drift” e “antigenic shift”, também reconhecidos para outros vírus RNA segmentados. Tais vírus, com seu genoma RNA apresentam altas taxas de erros acumuladas durante seu ciclo de multiplicação, causados em instância pelo efeito da RNA polimerase que não possui atividade revisora. Essa alta taxa de mutação da RNA polimerase viral seria o fator resultante, que levaria a variações nas propriedades antigênicas dos bunyavirus, possibilitando o escape do vírus ao sistema imune do hospedeiro. A esse mecanismo dá-se o nome de “antigenic drift”, que o resultado de mutações pontuais no genoma do vírus que alteram sua estrutura antigênica. A população resultante dessas mutações é freqüentemente referida como uma “quasispécie” (WEBER *et al.*, 2002b; DOMINGO & GOMEZ , 2007).

Outro mecanismo pelo qual os bunyavírus escapam à resposta imune do hospedeiro é chamado “antigenic shift”, o qual ocorre quando os vírus trocam seus fragmentos genômicos originando novos vírus rearranjados ou “reassortant”. Os vírus rearranjados também ocorrem na natureza. Tais rearranjos genéticos levam às alterações antigênicas por gerarem novas variantes de proteínas virais imunogênicas às quais o hospedeiro não está adaptado (WEBER *et al.*, 2002b; DOMINGO & GOMEZ , 2007).

Com relação à imunidade inata, os bunyavirus apresentam também mecanismos para evadir do sistema imune do hospedeiro através da inibição do sistema IFN. A proteína NSs atua como o fator de virulência necessário para impedir a síntese de IFN em células infectadas (BRIDGEN *et al.*, 2000; WEBER *et al.*, 2002a,b; STREITENFELD *et al.*, 2003; BILLECOCQ *et al.*, 2004; LEONARD *et al.*, 2006; LE MAY & BOULOY, 2012). Os mecanismos de escape ao sistema imune mediada por esta proteína foi mais bem estudado para o BUNV e o LACV, onde NSs prejudica a resposta antiviral através do bloqueio da transcrição celular, através da proteólise da RNA polímera II (LE MAY & BOULOY, 2012). Os arbovírus da família *Bunyaviridae* precisam rapidamente estabelecer uma intensa viremia para serem transmitidos para novos insetos vetores, utilizando para esse fim, esta proteína, para subverter então o sistema imune dos hospedeiros mamíferos (BLAKQORI *et al.*, 2007).

IKEGAMI e colaboradores em 2009 demonstraram mais uma função para NSs, esta proteína causa um decréscimo de PKR, um importante gene estimulado por interferon (ISG) que possui atividade antiviral, permitindo uma eficiente replicação viral durante o curso de uma infecção.

Assim a proteínas NSs dos bunyavírus, são responsáveis por bloquear a produção de IFN em células infectadas. Como resultado, ocorreria um favorecimento da replicação viral, uma vez que este escaparia à primeira linha de defesa do organismo frente a uma infecção viral, ou seja, do sistema IFN, podendo então produzir grandes quantidades de sua progênie.

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.

1.5.4 – Interferons e os *Orthobunyavirus*

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, Vaccínia, ebola, dentre outros. Os IFN têm sido utilizados também para o tratamento de infecções crônicas causadas pelos vírus da hepatite B e C.

Dados produzidos por pesquisadores do Laboratório de Vírus ICB da UFMG sobre a atividade antiviral dos IFN contra membros da família *Bunyaviridae*, apontam para a importância do sistema interferon para as defesas do hospedeiro e, conseqüente, estimulação das respostas imune inata e adaptativa. 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 IFN e, o vírus Apeu o mais sensível à ação do IFN em células de membranas amnióticas humanas (MEZÊNCIO *et al.*, 1978; PETRILLO-PEIXOTO, *et al.*, 1980). Ficou demonstrado, portanto que, a sensibilidade ao IFN amniótico é dependente do tipo de ensaio utilizado. Por exemplo, em ensaios de inibição do efeito citopático, o CARV e ITQV foram menos sensíveis que o APEUV, enquanto que, em ensaios de redução de placa, a sensibilidade foi maior para o vírus Sindbis, seguido pelo vírus da estomatite vesicular (VSV), MTBV e por fim, pelo APEUV (PETRILLO-PEIXOTO *et al.*, 1980).

MACHADO em 1998 verificou que os vírus Apeu, Itaquí, Marituba e Oriboca apresentavam uma multiplicação mais eficiente em células VERO do que em células WISH. O fato de células WISH serem capazes de produzir interferon, diferentemente do que ocorre em células VERO, aliado ao fato dos vírus do grupo C apresentarem sensibilidade à ação desta citocina, levantou a hipótese de que os títulos virais mais baixos em WISH poderiam resultar da produção de alguma substância com atividade antiviral relacionada ao sistema interferon. Então, foi investigado se a proteína MxA poderia estar envolvida neste processo, uma vez que a atividade antiviral da proteína MxA já tinha sido demonstrada para outros membros da família *Bunyaviridae*. Os resultados

mostraram que, nessa linhagem celular, a menor multiplicação dos vírus do grupo C não estava relacionada à atividade de MxA mas provavelmente a outros fatores que as tornariam menos susceptíveis .

Recentemente ALMEIDA e colaboradores em 2008 demonstraram a atividade antiviral dos IFN do tipo I e III ao proteger a célula VERO contra o vírus APEU. Todos os IFN testados foram hábeis em induzir um estado antiviral contra o APEUV, sendo esta atividade dose-dependente. Adicionalmente, a atividade antiviral dos IFN tipo III não necessitam da presença dos IFN tipo I, pois ao misturar ambos os tipos de IFN, a atividade antiviral não foi aumentada ao se comparar com cada tipo sozinho. Os IFN testados, também foram capazes de proteger as células mononucleares do sangue periférico da infecção pelo APEUV.

Magalhães em 2008 demonstrou que, a multiplicação em cultura de células do APEUV e CARV foi significativamente inibida pelo pré-tratamento das células com o IFN- α . A inibição da multiplicação foi dose-dependente.

ASSIS em 2009 demonstrou que, os IFN tipo I α e β e também os IFN tipo III foram capazes de proteger células VERO, contra infecção pelo ORIV. A atividade antiviral verificada foi dose dependente, e o IFN β o que mais inibiu a multiplicação deste vírus. Adicionalmente foi observado que, células VERO tratadas com uma combinação destes IFN em doses altas ou baixas, não tiveram um efeito antiviral aditivo sobre a multiplicação do ORIV e ainda que a expressão dos ISGs (2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA), quantificados por PCR em tempo real, foi aumentada nas células A549 após infecção pelo ORIV sugerindo que, sistema imune inato desempenha um importante papel no controle do ORIV.

LIVONESI e colaboradores em 2007 demonstraram que, IFN- α foi capaz de apresentar atividade antiviral *in vitro* contra diversos orthobunyavirus tais como Oropouche, Caraparu, Guama, Guaroa e Tacaiuma. Adicionalmente, foi demonstrado atividade antiviral *in vivo* do IFN- α contra o vírus Oropouche e Guaroa quando usado para tratamento profilático sugerindo portanto, o

potencial terapêutico dos IFN na prevenção de doenças causadas por membros da família *Bunyaviridae*.

A atividade antiviral dos IFN ocorre tanto por causa dos genes estimulados por interferon (ISGs) induzidos, quanto pela modulação de uma resposta imune. Dos ISGs ativados, três deles possuem funções antivirais bastante conhecidas: 2'5'-OAS, PKR, 6-16, que interferem com a transcrição, tradução ou replicação do genoma viral (LEVY *et al.*, 2003; BONJARDIM, 2005; BONJARDIM *et al.*, 2008). Magalhães em 2008 demonstrou que os vírus APEUV e CARV exibiram uma notável capacidade em induzir os genes de respostas aos IFN 2'5'-OAS, PKR e 6-16. Também Almeida e colaboradores em 2008 demonstraram que, os IFN- α 2A, β , λ 1 e λ 2 induziram a expressão de 2'5'-OAS e 6-16.

Portanto os IFN são as moléculas chave para um eficiente controle da replicação dos bunyavírus e também por estimular a resposta imune inata e adaptativa. Na infecção por estes vírus uma resposta eficiente e robusta aos IFN é importante para controlar a fase inicial de viremia, fazendo com que o sistema imune adaptativo tenha tempo suficiente para desenvolver anticorpos neutralizantes e proteger o hospedeiro de infecção recorrente.

II – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os arbovírus têm se mantido em equilíbrio nas florestas, em ciclos envolvendo artrópodes hematófagos e vertebrados silvestres. O avanço da civilização para estas áreas aumentam os riscos da exposição do homem, a tais agentes infecciosos. 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 enzooticos. 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.

A grande diversidade de arbovírus existente no Brasil, principalmente na região Amazônica, preocupa a sociedade científica quanto à possibilidade de novas espécies de viroses emergentes. Os *Orthobunyavirus* do Grupo C (*Bunyaviridae*) se incluem nesse contexto. Os membros Apeu, Bruconha, Caraparu, Itaqui, Marituba, Nepuyo, Murutucu e Oriboca foram isolados na Amazônia e, apesar dos estudos sorológicos e biológicos terem sido realizados na década de cinquenta naquela região, ainda pouco se sabe sobre esses vírus. A literatura sobre os arbovírus do Grupo C é escassa e ainda hoje sua importância é subestimada. Assim, em países como o Brasil, cuja maioria da superfície territorial ainda está recoberta por áreas florestais, faz-se necessária realização de estudos visando uma maior compreensão desses vírus nos seus diversos aspectos.

Ademais, são vários os arbovírus re-emergentes de importância já há muito reconhecida. No Brasil epidemias de dengue e febre amarela silvestre surgem ano após ano. Além dessas consagradas arboviroses, temos ainda casos de surtos pelo vírus Oropouche (OROV) (família *Bunyaviridae*), com epidemias registradas nos estados do Amazonas, Pará, Amapá, Tocantins, Rondônia e Maranhão. Existem evidências sorológicas mostrando que o OROV circule em outras regiões do Brasil, pois, anticorpos já foram encontrados em indivíduos no estado de São Paulo e foi isolado pela primeira vez em 2005 em Arinos, Minas Gerais.

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.

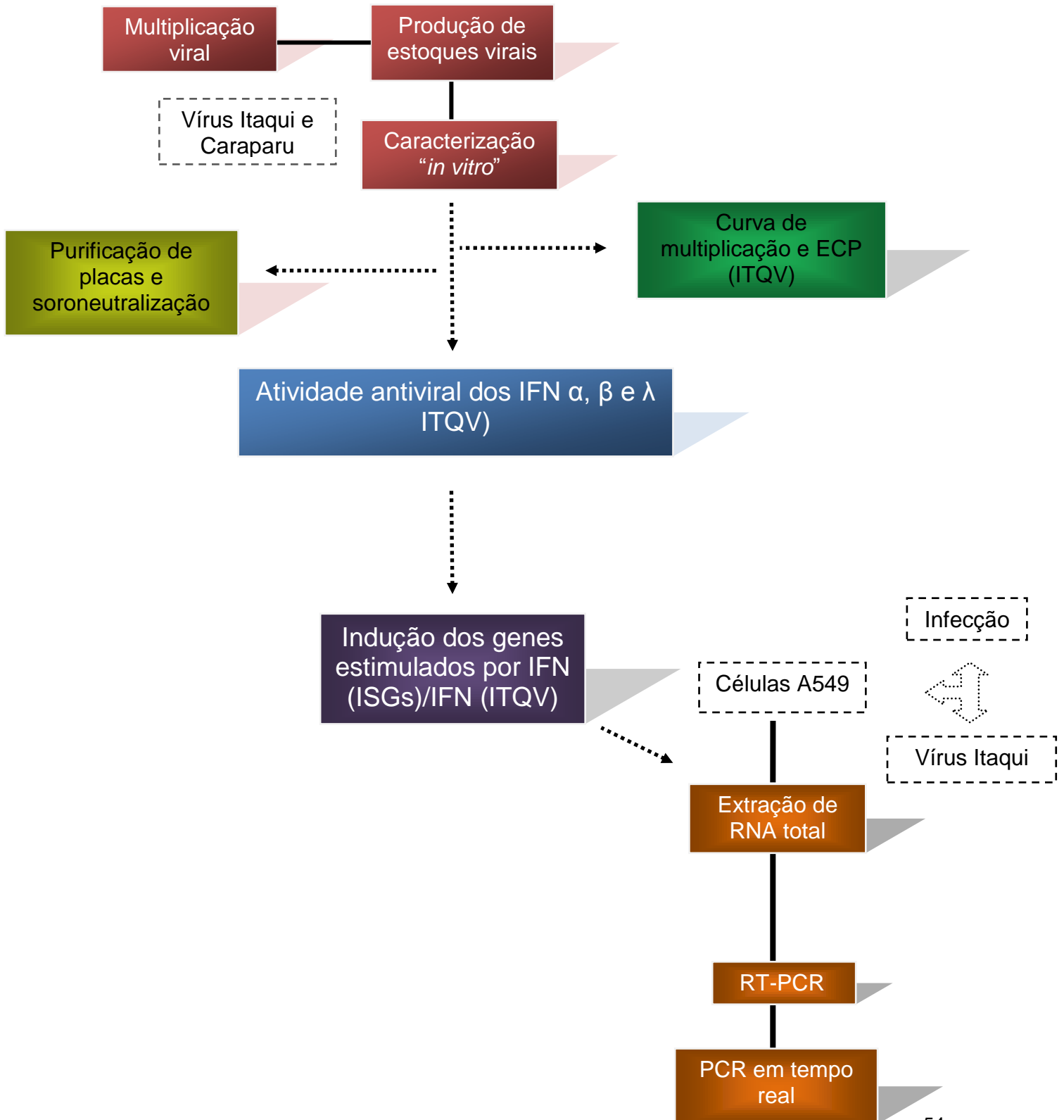
O risco da emergência de novas arboviroses no Brasil está diretamente relacionado à existência de grandes centros urbanos, infestados de mosquitos como o *Culex* e o *Aedes aegypti*. Além disso, as mudanças ecológicas e sociais produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência dos vetores e criar novos 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.

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. Isto faz com que as perspectivas para o diagnóstico apontem para a substituição dos métodos sorológicos por métodos mais sensíveis, como o diagnóstico molecular, já que o isolamento e sua caracterização posterior são mais demorados. Entretanto, para isso, será necessária a determinação da sequência de nucleotídeos do genoma ou pelo menos de algum dos três fragmentos que o compõe.

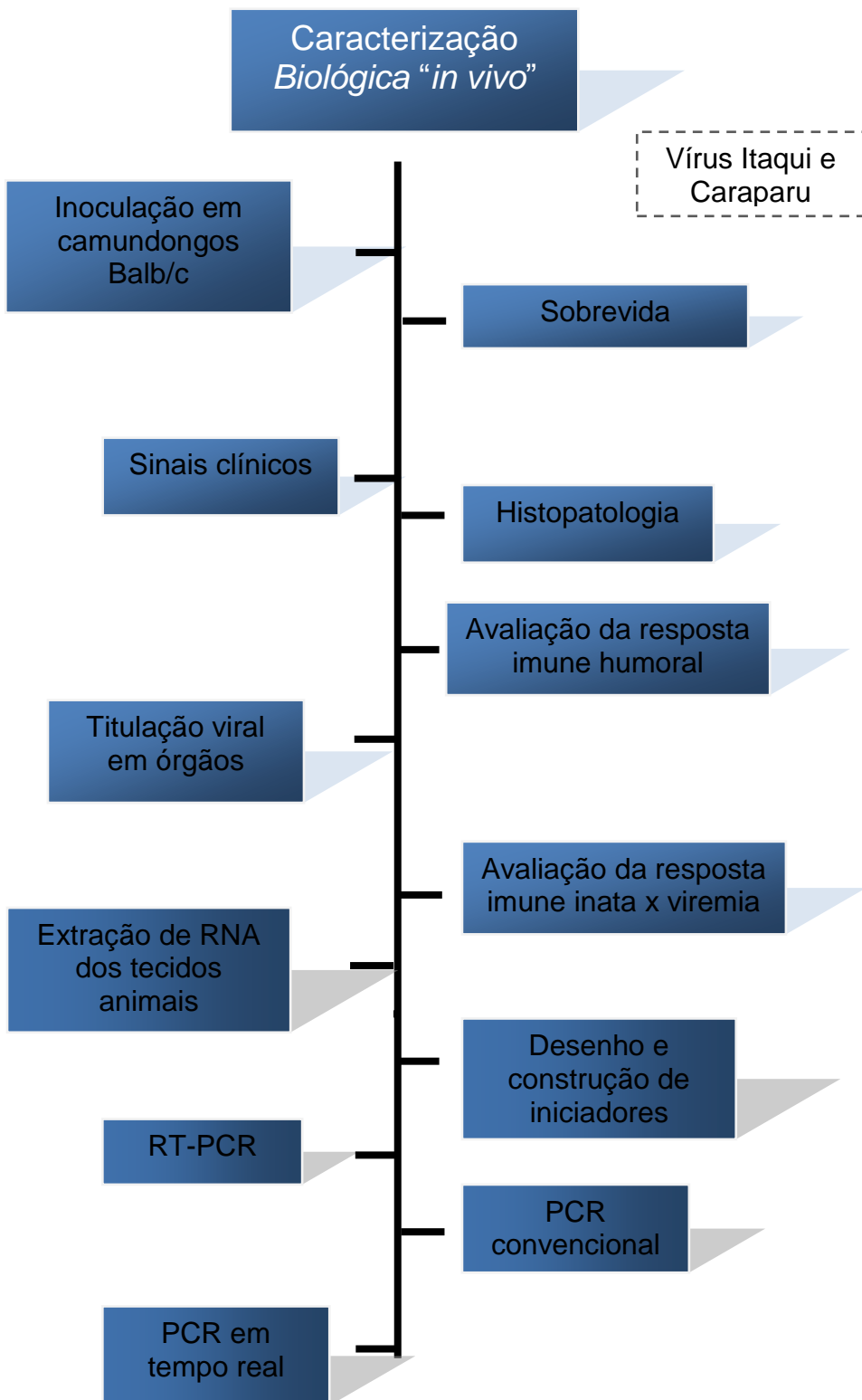
Assim, este trabalho tem como objetivo dar prosseguimento aos demais estudos envolvendo os *Orthobunyavirus* do grupo C, que vêm sendo realizados pelo Laboratório de Vírus desde a década de setenta. Sendo assim, nossa proposta é realizar a caracterização destes vírus sobre vários aspectos da sua biologia o que contribuirá significativamente para a taxonomia, evolução e potencial patogênico destes vírus.

III – FLUXOGRAMA DE TRABALHO

3.1 – Caracterização biológica “*in vitro*”



3.2 – Caracterização biológica “in vivo”



IV – OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Caracterizar biologicamente e avaliar a atividade antiviral dos IFN do tipo I e III contra o *Orthobunyavirus* do Grupo C: Itaqui (BeAn12797) e realizar estudos histopatológicos, bioquímicos, imunológicos e moleculares em camundongos Balb/c infectados experimentalmente com os vírus Itaqui (BeAn12797) e Caraparu (BeAn3994) .

4.2 - Objetivos específicos

4.2.1 – Caracterização biológica “*in vitro*” do ITQV

- ✓ Purificar através do método de placas de Dulbecco, a amostra do ITQV e avaliar as reações sorológicas cruzadas entre os clones virais;
- ✓ Analisar o curso da infecção do ITQV em células VERO e avaliar o efeito citopático (ECP);
- ✓ Caracterizar a curva de multiplicação do vírus;

4.2.2 – Atividade antiviral dos IFN contra o ITQV

- ✓ Verificar a atividade antiviral dos IFN alfa, beta e lambda 2 comparando-as;
- ✓ Avaliar a indução dos genes ativados por IFN (ISGs) MxA, 2`5`OAS, PKR e 6-16, em células A549 após infecção pelo ITQV;
- ✓ Avaliar os níveis de expressão dos IFN do tipo I e III em células A549 após infecção pelo ITQV;

As etapas descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2 já foram realizadas para o CARV por Magalhães em 2008 e por Pinto em 2011.

4.2.3 – Caracterização biológica “*in vivo*” do ITQV e CARV

- ✓ Verificar a susceptibilidade de camundongos Balb/c neonatos ao ITQV e CARV e calcular a LD50;
- ✓ Verificar a susceptibilidade de camundongos Balb/c adultos jovens infectados pela via subcutânea ao ITQV e ao CARV;
- ✓ Observar a evolução dos sinais clínicos;
- ✓ Titular amostras do sangue para verificar a viremia e também de importantes órgãos como rim, baço e fígado;
- ✓ Determinar as possíveis alterações em importantes órgãos como rim, baço e fígado nestes animais, utilizando-se de análises histopatológicas;
- ✓ Avaliar a resposta imune inata através da detecção de IFN;
- ✓ Avaliar a resposta imune humoral pela detecção de anticorpos neutralizantes;
- ✓ Detectar o RNA no soro e fígado dos animais infectados pelo ITQV e CARV através da PCR convencional quando possível;
- ✓ Determinar os níveis das transaminases hepáticas oxalacéticas e pirúvicas no fígado dos animais infectados;
- ✓ Padronização da técnica de PCR em tempo real para uma rápida detecção e quantificação do ITQV e CARV em camundongos Balb/c infectados via SC;
- ✓ Determinar a cinética de expressão de diferentes citocinas e quimiocinas no fígado dos animais infectados pelo ITQV e CARV.

V – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Cultivo de Células

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 e purificação dos vírus pelo método de purificação de placa (Dulbecco, 1954).

Células L929 As células de fibroblasto murino L929, extraídas de tecido conjuntivo de *Mus musculus*, 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 da medida da atividade antiviral de IFN.

Células A549. As células A549 são células derivadas de carcinoma de pulmão humano e foram utilizadas nos experimentos de cinética indução dos ISG 2'5'OAS, PKR e 6-16 após infecção com o ITQV.

5.2 – Meio de cultura e subcultivos

As células VERO e L929 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 anfotericina B (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 20mM; pH 7,2) e solução de tripsina/EDTA (NaCl 136 mM; KCl 5 mM; glicose 55 mM; NaHCO₃ 69 mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5 mM; 1% vermelho de fenol).

5.3 – Amostra de vírus

5.3.1 – Origem

As amostras de *Orthobunyavirus* do grupo C Itaqui (BeAn 12797) e Caraparu (BeAn 3994), obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) foram obtidas da American Typ Culture Collection (ATCC) e o vírus da encefalomiocardite murina (EMC), cedido pelo Dr. IAN KERR, Londres, Reino Unido, todos eles mantidos no laboratório de Vírus por um número reduzido de passagens.

5.3.2 – Produção de estoques virais

Os vírus Itaqui e Caraparu foram inicialmente multiplicados em garrafas redondas, contendo monocamada completa de células VERO. A adsorção foi feita com uma m.o.i de 0,1 a 37°C, com homogeneização constante durante 1 hora, em atmosfera de 5% de CO₂. Após esta etapa, foram acrescentados 40 mL de meio DMEM com 1% de SFB e as garrafas foram incubadas até o efeito citopático (ECP) atingir 70 a 90% da monocamada.

5.4 – Titulação de vírus

5.4.1 – Titulação pelo método de placa modificado (Dulbecco, 1954)

A modificação do método de Dulbecco foi a substituição do ágar pela carboximetilcelulose (CMC). Em resumo, foram adicionados 400µl das diluições (5 câmaras/diluição) dos vírus à monocamada de células VERO (0,7 x 10⁶ de células/câmara) com uma confluência de 90%, em microplaca (Corning®, USA) de seis câmaras. Ao controle de células foi adicionado meio sem vírus. Após 1 hora de adsorção, o meio foi removido e foram

acrescentados, a cada câmara, 2ml de DMEM acrescido de CMC e suplementado com 1% de SFB e a microplaca incubada a 37°C. Após aproximadamente 5 dias, o meio foi desprezado e as células fixadas em solução 10% de formol por 30 min. Em seguida, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta (1% de corante em 20% de solução alcoólica) por 15 min. O título foi expresso pelo número médio de unidades formadoras de placas (UFP) obtido nas câmaras cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição e convertido para UFP/mL.

5.5 – Purificação do vírus pelo método de placa (Dulbecco, 1954)

Monocamadas confluentes de células VERO presentes em placas de 60 mm de diâmetro (Corning®, USA) foram infectadas com 500 µL da diluição 10^{-6} dos vírus Itaqui e Caraparu, para formar placas de lise isoladas. A adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com homogeneização constante durante 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 a observação de placas de lise. Com a visualização das placas de lise, os clones virais foram coletados com o auxílio de ponteiros e transferidos para microtubos contendo 100 µL de DMEM sem SFB. Os clones dos vírus foram escolhidos aleatoriamente e alguns utilizados para passagem em células VERO, em microplacas de 24 cavidades. Após ECP de 70 a 80% da monocamada o sobrenadante foi coletado, sendo uma alíquota armazenada a -70°C e outra usada para uma segunda passagem, em garrafas de 25 cm². Dessa segunda infecção, o sobrenadante obtido foi centrifugado a 2.500 rpm por 5 min., em centrífuga refrigerada Sorvall RT6000B, em rotor HI000B, a 4°C. A titulação dos vírus presentes no sobrenadante foi feita em células VERO e alíquotas de 500 µL foram armazenadas a -70°C.

5.6 – Anticorpos

O anticorpo utilizado, foi obtido a partir de fluido ascítico murino anti-arbovírus do grupo C-I (incluindo anti-Caraparu, Ossa, Apeu, Vinces e Bruconha), adquirido do National Institutes of Health (NIH Research Reagente, N° catálogo G201-701-567, 1966).

5.7 – Ensaio de soroneutralização

Antes de serem utilizadas em ensaio de soroneutralização, as amostras de fluido ascítico, foram incubadas em banho-Maria a 56°C, por 30 min. A titulação de Ac foi feita diluindo-se o soro na razão de 2, em 250 µl de DMEM com 1% de SFB, em microplacas de 96 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 ITQV (300 UFP). O volume do soro (250 µl), e o volume de vírus adicionado foi levado 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 à monocamada confluyente de células VERO nas microplaca de 6 câmaras. Em cada microplaca foram feitos controles de células adicionados de 500 µl de DMEM com 1% de SFB, enquanto que, nos controle de vírus (250 µl) sem Ac, foram adicionados 250 µl de DMEM 1% de SFB. Em seguida as microplacas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C e observadas diariamente. Quando o controle de vírus apresentava um ECP de 75-100% as células foram coradas, o que ocorreu em torno de 72h de após infecção. O título de anticorpos foi então calculado pelo valor inverso da diluição onde ocorreu uma redução de 50% do ECP.

5.8 – Atividade antiviral dos IFN do tipo I e tipo III contra o ITQV em células VERO

A sensibilidade do ITQV aos IFN- α humano (HuIFN- α 2A), IFN- β (HuIFN- β), recombinantes e IFN- λ 2 (HuIFN- λ 2), foi observada em células VERO. Para tal, um total de 7×10^5 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 a cada cavidade 0,1 a 10000 unidades/mL, na razão de 10, diluídos em DMEM 1% de SFB (DMEM1%SF). Ao controle de células não foram adicionados IFN e receberam apenas DMEM1%SF. Após 18h do tratamento com os IFN, 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 à 37°C, sob homogeneização constante, para adsorção do vírus. Em seguida, a monocamada de células foi lavada 2 vezes com PBS 1X, para retirar todos os vírus que não adsorveram, adicionada de 2 mL de DMEM1SF acrescido de CMC suplementado com 2% de SFB, e a microplaca incubada a 37°C. As microplacas foram então mantidas em estufa de CO₂, a 37°C, para a medida da atividade antiviral e o título dos vírus foram expressos em UFP/mL.

5.9 - Indução dos genes estimulados por IFN (ISGs)

5.9.1 – Extração de RNA total celular

As células A549 foram crescidas em microplacas de 6 câmaras e após 80% de confluência foram infectadas com o ITQV, em uma m.o.i. de 1, com exceção do controle de células. Nos tempos 6, 12 e 24 h.p.i., o RNA total celular foi extraído com o kit RNeasy (Qiagen, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante.

5.9.2 – Reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi feita com 5µl do RNA total extraído das culturas de células infectadas ou não. As reações foram feitas utilizando-se a enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase-Promega), tampão 5X, dNTPs, oligo dT e 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 a mistura incubada 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.

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

A indução dos ISGs MxA, 6-16, 2'5'OAS e PKR dos IFN-β, λ1 e λ2/3 e do IRF-7 foi avaliada por PCR em tempo real, após infecção com o ITQV. O gene constitutivo β-actina foi utilizado em reações para normalizar a quantidade interna de RNA. Os pares de iniciadores para os genes utilizados MxA, 6-16, 2'5'OAS, PKR e β-actina foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marco Antonio da Silva Campos (TABELA 3) e os demais iniciadores foram descritos por Kim e colaboradores em 2007.

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 duplicata utilizando SYBRGreen® Master Mix Applied Biosystems. Os valores de ΔCt 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.

MxA	FWD – 5'ATCCTGGGATTTTGGGGCTT3' REV – 5'CCGCTTGTGCTGGTGTGCG 3'
6-16	FWD – 5'CATGCGGCAGAAAGGCGGTAT 3' REV – 5'CGACGGCCATGAAGGTCAGG 3'
2'5'OAS	FWD – 5'AACTGCTTCCGACAATCAAC 3' REV – 5'CCTCCTTCTCCCTCCAAAA 3'
PKR	FWD – 5'TCTACGCTTTGGGGCTAA VER – 5'GCCATCCCGTAGGTCTGT 3'
IFN-β	FWD – 5'CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGC 3' REV – 5'CCAGGCACAGRGACTGTACTCCTT 3'
IFN-λ1	FWD – 5'GGCCTCCAGGACCTTCAGC 3' REV – 5'CTTCCAAGCCCACCCCAACT 3'
IFN-λ2/3	FWD – 5'AGTTCCGGGCTGTATCCAG 3' REV – 5'GAGCCGGTACAGCCAATGGT 3'
IRF-7	FWD – 5'CAAGTGCAAGGTGTACTGG 3' REV – 5'CAGGTAGATGGTATAGCGTGG 3'
β-actina	FWD – 5'TGACGGGGTCACCCCACTGTGCC 3' REV – 5'CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGG3' 3'

TABELA 3 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para avaliar a indução dos ISGs MxA, 6-16, 2'5'OAS, PKR e β-actina.

5.10 – Animais

5.10.1 – Origem

Foram utilizados neste trabalho camundongos da linhagem Balb/c, adultos jovens com 4-5 semanas. Todos os camundongos foram obtidos do CEBIO (Centro de Bioterismo) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram mantidos, manipulados e sacrificados conforme recomendações do “Guia de Manutenção e Uso de Animais de Laboratório”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFM e encontra-se em anexo. Os animais após infecções foram mantidos em gaiolas com sistema de microisolador.

5.10.2 – Anestesia

Previamente á infecção subcutânea e ao sacrifícios dos animais, estes foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Quetamina/Xilazina

(respectivamente 3,2 mg e 0,16 mg/animal em solução salina 0,9%, numa proporção de 4:1:5) num volume de 50-100 µL com a ajuda de uma seringa de insulina (BD Plastipak). Assim, todos os animais que não vieram a óbito, ao final do experimento foram eutanaziados por deslocamento cervical.

5.10.3 – Infecção de camundongos Balb/c neonatos

5.10.3.1 – Observação dos sinais clínicos e determinação da LD₅₀

Grupos contendo 4 ou 5 animais neonatos foram divididos e cada grupo foi inoculado via intracerebral (IC) com diferentes diluições do ITQV e do CARV (diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ou 10^{-9}), em 20 µl de meio DMEM sem SFB. Os camundongos não receberam nenhum pré-tratamento antes das injeções, como anestésicos ou soluções para assepsia do local. As aplicações foram feitas na porção mediana do hemisfério lateral direito do cérebro, com o auxílio de uma seringa de tuberculina (BD Plastipak 0,38 x 13- 27,5 G1/2).

Camundongos controle, receberam injeções com DMEM sem SFB, num volume correspondente àqueles dos animais infectados. Após a injeção, os camundongos voltaram para a companhia da mãe, sendo observados em intervalos regulares com relação aos sinais clínicos de doença. A sobrevivência dos animais foi observada por um período de 10 dias e a dose letal para 50% dos animais (LD₅₀) foi calculada segundo método REED & MUENCH (SCHMIDT, 1979).

5.10.4 – Infecção de camundongos Balb/c adultos via subcutânea (SC)

5.10.4.1 – Observação dos sinais clínicos

Os camundongos, previamente anestesiados, foram infectados com 10^3 , 10^4 e 10^5 UFP, em 30 μ L de meio DMEM, dos vírus Itaqui e Caraparu (5 animais por inoculação) via SC, feitas na porção mediana do dorso do animal. Foram dois os grupos controle utilizados: um deles os camundongos receberam injeções do sobrenadante de células Vero, coletados por ocasião da titulação de vírus (mock), segundo os animais não foram inoculados. Após a injeção, sinais clínicos dos camundongos foram observados diariamente e pesados em intervalos de 2 dias, tendo sido observados por um período de 15 ou 18 dias.

5.10.4.2 – Obtenção dos órgãos e análise histopatológica

Os órgãos retirados foram o fígado, baço e rim dos animais infectados, que porventura vieram a óbito ou após 15 ou 18 d.p.i. para análise histopatológica, isolamento de vírus e extração de RNA.

Para histopatologia os órgãos foram fixados imediatamente após coleta, em solução de formol a 10%, em PBS, e depois embebidos em parafina. Em seguida, cortes dos blocos contendo os tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E) (Reagente, Rio de Janeiro, Brasil) para estudos histopatológicos.

A titulação dos vírus e extração de RNA foi feita nos órgãos coletados separadamente. Após serem pesados, colocados em tubos Eppendorf e armazenados a -70°C até serem processados.

Para o isolamento dos vírus os órgãos foram macerados com auxílio de um pistilo de plástico, em DMEM1S (250 μ L de meio por órgão). Em seguida, as

amostras foram centrifugadas a 5000 rpm em microcentrífuga (modelo 5417R) por 5 min. à 4°C e os sobrenadantes coletados, sendo posteriormente usados para ensaios de titulação, feito conforme descrito anteriormente (ver item 4.3.1).

A extração do RNA foi feita utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) segundo o protocolo indicado pelo fabricante. Brevemente, o tecido (aproximadamente 100mg) foi homogeneizado com o auxílio de um pistilo em reagente Trizol. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente foi adicionado clorofórmio. A mistura foi homogeneizada e incubada novamente à temperatura ambiente por 15 min. A separação das fases foi feita por centrifugação a 12000g por 15 min. à 4°C, em centrífuga Eppendorff 5417R. a fase aquosa (superior transparente), onde o RNA está presente, foi coletada e transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com adição de isopropanol, seguida de centrifugação a 12000 g por 10 min. à 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o RNA ressuspendido em água DEPC. O RNA foi então armazenado no freezer -70°C.

Os RNAs extraídos foram agora tratados com DNase previamente à realização da transcrição reversa. O protocolo foi feito segundo recomendações do fabricante da DNase RNase free (Biolabs). O RNA foi então armazenado no freezer -70°C para posterior utilização.

5.10.4.3 – Produção de anticorpos, IFN nos soros de animais infectados e determinação da viremia

Obtenção dos soros

Antes de serem sacrificados, os animais foram anestesiados e o sangue foi obtido através do plexo braquial ou do seio retro-orbital. Para obtenção do soro, o sangue foi mantido a 37°C por 15 min., 4°C por 30 min. e em seguida foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min. a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5417R). Os soros foram então coletados e transferidos para tubos

novos, sendo então armazenados em freezer a -70°C . Posteriormente, a presença de anticorpos neutralizantes foi medida através de ensaio de soroneutralização e o IFN foi medido nos soros dos animais nos momentos iniciais da infecção: 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h.p.i quando possível.

Ensaio de soroneutralização

Antes de serem submetidas ao ensaio de soroneutralização, as amostras de soro foram inativadas com luz ultra violeta por 5 min. e incubadas em banho-maria a 56°C por 30 min. para inativar o sistema do complemento, que poderia ser tóxico para as células. Então, após a inativação, o soro foi diluído na razão de 2, em 200 μL de DMEM com 1% de SFB, em placas de 96 câmaras, nas seguintes diluições: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 e 1:5120. Foram acrescentados a cada diluição, 200 μL dos vírus Itaqui e Caraparu, contendo uma quantidade fixa de 100 TCID₅₀, que é a quantidade de vírus que causa um efeito citopático (ECP) na cultura de tecido em 48 horas. Ao adicionar 200 μL das diluições do vírus aos soros, esses passaram a uma nova diluição na razão de 2, sendo então: 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120 e 1:10240.

A mistura soro+vírus foi incubada a 37°C por 1 hora, para permitir a interação vírus-anticorpo, quando foi então adicionada às placas de microtécnica contendo monocamada confluyente de células VERO. As colunas de cada placa correspondentes ao controle de células receberão 400 μL de DMEM 1% de SFB e as colunas correspondentes ao controle de vírus receberam somente 400 μL do vírus diluído. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, á 37°C . A leitura do ECP foi feita a cada 12 horas, durante 2 dias. As placas foram coradas 3 d.p.i., quando o controle de vírus apresentou um ECP de 75-100%. O título de anticorpos foi então calculado como o inverso da diluição onde houve redução de 50% do ECP.

Titulação de IFN

Os soros obtidos foram submetidos à luz UV por 3 min. para inativação de vírus. Em seguida, foram processados para o ensaio de titulação de IFN por medida da atividade antiviral. A presença do IFN foi detectada pela inibição da infecção de células L929 EMC. Como controle foi utilizado o IFN recombinante humano HuIFN- α 1 α 2 que, apesar de humano, possui atividade em células murinas (WEBER *et al.*, 1987).

Em resumo, as amostras dos soros foram diluídas em DMEM com 1% de SFB na razão de 2, de 1:10 até 1:1280. Então, 100 μ L foram aplicados nas câmaras de microplaca de 96 câmaras contendo monocamada completa de células L929. O IFN controle foi diluído em DMEM com 1% de SFB na razão de 2, de 10^{-3} até 10^{-5} . Uma coluna com quatro cavidades foi utilizada para controle de células. Após o tratamento por 2h das células com os sobrenadantes ou com o IFN controle, foram adicionados em cada cavidade 100 μ L do vírus EMC contendo 100 TCID₅₀. Quatro cavidades foram reservadas para o controle de vírus (células + DMEM 1% de SFB + vírus EMC). Ao adicionar 100 μ L das diluições dos vírus às placas, as amostras dos sobrenadantes, assim como do IFN controle, passaram a uma nova diluição na razão de 2.

A leitura das placas foi feita a cada 12h durante 48h, sendo as células coradas quando o controle de vírus apresentou um ECP de 75-100% (4+). O título de IFN em cada amostra foi expresso pela recíproca da diluição na qual houve redução em 50% do ECP quando comparado ao ECP observado nas câmaras controle de vírus.

Determinação da viremia

Alíquotas dos soros foram processadas por ensaio de titulação por contagem das unidades formadoras de placas. O título de vírus foi expresso como UFP/mL de soro. Além disso, foi extraído RNA do soro dos animais para posterior utilização em reações de PCR convencional ou PCR em tempo real.

5.10.4.4 – Extração de RNA do soro dos animais

Os soro dos animais foram ainda utilizados para extração do RNA segundo o protocolo do kit RNeasy Mini (QIAGEN) especial para pequenas quantidades de RNA. Brevemente, o soro foi homogeneizado com o auxílio de um pistilo em tampão RLT (contendo isotiocianato de guanidina e beta mercaptoetanol). O lisado foi então centrifugado em microcentrífuga a 14000 rpm, transferido o sobrenadante para um novo tubo e adicionado igual volume de etanol 70%. Essa solução foi aplicada na coluna RNeasy, centrifugada (14000 rpm) e seu líquido foi descartado. A coluna foi lavada com tampão RW1 e centrifugado novamente (14000 rpm) e o líquido que passou pela coluna foi então descartado. O tampão RPE foi então aplicado na coluna e centrifugado (14000 rpm) e o líquido descartado. O RNA foi eluído com água DEPEC (dietilpirocarbonato) e o material foi então armazenado em freezer a -70°C. Um microlitro do RNA extraído foi utilizado para a dosagem no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000.

5.10.4.5 – Atividade das transaminases Aspartato aminotransferase e Alanino aminotransferase

A atividade das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram quantificadas em amostras de soro individuais como enzimas marcadoras associadas a dano hepático. Para isso foi utilizado um kit colorimétrico comercialmente (Labtest, Belo Horizonte, Brasil). Os resultados foram expressos em U/mL de soro.

5.10.4.6 – Amplificação do genoma do CARV

Oligonucleotídeos iniciadores para a PCR convencional e PCR em tempo real para amplificação do genoma do CARV

Os iniciadores que foram utilizados para a amplificação do genoma do CARV por PCR convencional foram desenhados por Magalhães em 2008 partir de regiões conservadas entre o segmento S, M e L dos *Orthobunyavirus* disponíveis no GenBank. O par de iniciadores utilizados na PCR convencional para amplificar 265pb do segmento L do CARAV foram os seguintes: 5'-GTCAAAGCCAATGCAAGGAG-3' e 5'-GCAACACTGAAAGAATCC-3'.

Os iniciadores utilizados para a amplificação do CARV por PCR em tempo real foram desenhados, a partir da sequência do segmento L dos *Orthobunyavirus* disponíveis no GenBank, depositada por Magalhães em 2008. O par de iniciadores utilizados na PCR em tempo real para amplificar 102 pb do segmento L do CARAV foram os seguintes: 5'-TCCGGCAGTTGGGGATTGCG-3' e 5'-AAGCTTGGAGGGCACCCATGC-3'.

Condições da RT-PCR para as reações de PCR convencional e em tempo real para amplificação do genoma do CARV

Um micrograma de RNA foi incubado com 10 pM de primer, em quantidade suficiente de água para 15 µL por 5 min. à 70°C e, depois resfriado imediatamente em banho de gelo por mais 5 min. Simultaneamente foi preparado um homogeneizado com 5 µL do tampão da enzima M-MLV RT (Promega) (250 mM Tris pH 8.9, 15mM MgCl₂, 375 mM KCl, 50 mM DTT), 1,25 µL de dNTP (10 mM), 200 U de transcriptase reversa M-MLV RT (Promega) e água livre de RNase para um volume final de 25 µL. Este homogeneizado foi adicionado ao restante da reação e incubado á 42°C por 60 min. E depois 70°C por 15 min. Os cDNAs assim obtidos foram, então, submetidos à amplificação por PCR convencional e em tempo real.

Reação em cadeia da polimerase - PCR convencional para amplificação do genoma do CARV

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20 µl, sendo utilizados 2 µl das reações de RT (item 5.8.4.4)), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl do tampão (10X), 0,3 µl da enzima Taq 10 (0,2 U/µl), 0,5 µl do iniciador verso e 0,5 µl do iniciador reverso (10 pM/µl), 0,5 µl de dNTPs (10 mM) e 12,2 µl de água.

As reações de PCR foram processadas em termociclador (Gradiente Thermal Cycler, Biocycler MJ96+/MJ96G), sob um ciclo de 3 min. a 95°C, 35 ciclos de 40 seg a 94°C, 40 seg. a 58° C (temperaturas de pareamento) e 1-2 min. a 72°C, e um ciclo final de extensão de 5 min. á 72°C.

O DNA obtido foi então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para separação dos amplificados e corado com nitrato de prata para visualização.

Reação em cadeia da polimerase - PCR em tempo real para amplificação do genoma do CARV

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado 1 µL do cDNA obtido da reação de transcrição reversa (item 5.8.4.4) diluído 1:3; 1 µL de cada iniciador a 10µM e 10 µL do SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), contendo marcador SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTP, tampão e referência passiva I, no aparelho Applied Biosystems Step-One. As condições de amplificação foram 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos de por 95°C por 3 min. Após a reação, a especificidade dos amplificados foi analisada, conferindo parâmetros como a temperatura de dissociação (T_m) dada pela curva de dissociação específica para o transcrito alvo.

5.10.4.7 – Cinética de expressão de citocinas e quimiocinas

Para verificar a expressão dos mRNAs de IFNG (interferon gama), IFNB (interferon beta), IL6 (IL-6), IL1B (IL-1beta), TNFA (TNF-alfa), CCL2 (IP-10), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10) NOS2 e HPRT no fígado de camundongos Balb/c adultos jovens infectados com o CARV foram feitas reações de PCR em tempo real. Para isso reações de transcrição reversa foram previamente realizadas como descrito a seguir.

Os iniciadores utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de dados da literatura (GIULIETTI et al., 2001) como mostrado na TABELA 4. A reação de transcrição reversa foi feita utilizando-se 2 μ g de RNA incubados com 10 pM de oligoDT em quantidade suficiente de água para 15 μ L por 5 min. à 70°C e, depois resfriado imediatamente em banho de gelo por mais cinco min. Simultaneamente foi preparado um homogeneizado com 5 μ L do tampão da enzima M-MLV (250 mM Tris pH 8.9, 15mM MgCl₂, 375 mM KCl, 50 mM DTT) fornecido pelo fabricante, 1,25 μ L de dNTP (10 mM), 200 U de transcriptase reversa M-MLV e água livre de RNase para um volume final de 25 μ L. Este homogeneizado foi adicionado ao restante da reação e incubado à 42°C por 60 min.

As reações de PCR em tempo real foram feitas utilizado-se 1 μ L do cDNA obtido da reação de transcrição reversa diluídos 1:3; 1 μ L de cada iniciador a 10 μ M (Tabela 3) e 10 μ L do SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), contendo marcador SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTP, tampão e referência passiva I, no aparelho Applied Biosystems Step-One. As condições de amplificação foram 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 min., precedidos de por 95°C por 3 min.

Após a reação, a especificidade dos amplificadores foi analisada, conferindo parâmetros como a temperatura de dissociação (T_m) dada pela curva de dissociação específica para o transcrito alvo. Para a análise dos dados foi utilizado o método da Curva Padrão Relativa. A expressão do gene alvo foi

normalizada em relação ao gene constitutivamente expresso HPRT. Os resultados foram plotados como unidade arbitrárias. Todas as reações foram feitas em duplicata.

Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Tm
HPRT	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAACCG GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC	76,5°C
IL6	ACGGCCTTCCCTACTTCACA CCACGATTTCCAGAGAACA	79,5°C
IL1B	CGCAGCAGCACATCAACAAGAGC TGCCTCATCCTGGAAGGTCCACG	81,5°C
IFNB	CTGGAGCAGCTGAATGGAAA TGTCTGCTGGTCGAGTTCAT	79,5°C
IFNG	TCAAGTGGCATAGATGTGCAAGAA TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	76,5°C
TNFA	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	85,5°C
CCL2	5' CTT CTG GGC CTG CTG TTC A 5' CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	82,7°C
CCL3	5' ACT GCC TGC TGC TTC TCC TA 5' TTG GAG TCA GCG CAG ATC TG	80,7°C
CCL5	5' GTC GTG TTT GTC ACT CGA AGG A 5' GAT GTA TTC TTG AAC CCA CTT CTT CTC	79,8°C
CXCL10	5' GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT 5'GCT TCC CTA TGG CCC TCA TT	82,5°C
NOS2	5'CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT 5'CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG	79,8°C

TABELA 4 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para HPRT, citocinas e quimiocinas e NOS2.

5.11 – Análises estatísticas

Os resultados da atividade antiviral foram analisados através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey's. Já o resultado da produção de anticorpos foi analisado apenas pelo teste de variância (Teste One-Way ANOVA). E por fim, os resultados da PCR em tempo real, da dosagem das transaminases AST e ALT foram analisados utilizando o teste de variância

(ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 5 para Windows.

VI – RESULTADOS

6.1 – Caracterização ITQV (BeAn 12797)

6.1.1 - Curva de multiplicação e ECP em células VERO do ITQV

A linhagem celular Vero foi permissiva à multiplicação do ITQV, alcançando altos títulos. O ITQV quando inoculado em células VERO mostrou, inicialmente, ECP localizadas, com grupos de células arredondadas e refringentes. Com o decorrer da infecção, surgiram vários desses focos, que foram confluindo, ocasionando a lise da monocamada, culminando com 100% do ECP na monocamada de células.

A curva de multiplicação também foi estabelecida em células VERO (FIGURA 12) utilizando-se uma m.o.i de 1, tendo sido observado títulos de vírus, pelo método de Dulbecco modificado, que atingiram $1,6 \times 10^6$ UFP/mL. Os vírus já começam a ser detectados em 12 h.p.i. e o ECP de 100% foi observado 72 h.p.i., quando o título do vírus começou a diminuir.

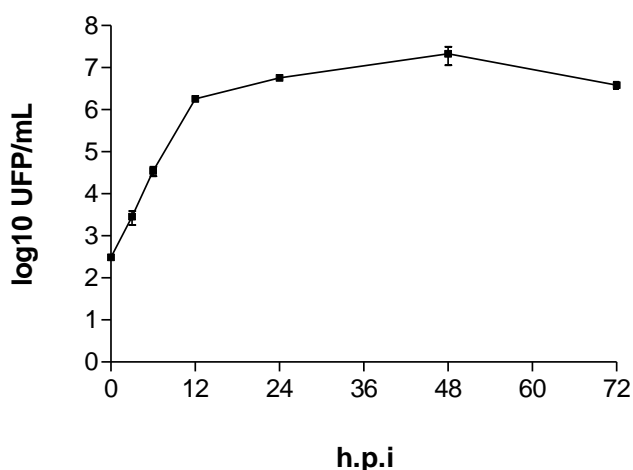


Figura 12 - Curva de multiplicação do ITQV, determinada por titulação de amostras do sobrenadante de células VERO infectadas numa m.o.i. de 1, coletadas em diferentes horas pós-infecção.

6.1.2 – Purificação de placas do ITQV pelo método de Dulbecco (1954)

A amostra do ITQV foi purificada 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 purificação foram obtidos clones isolados do vírus Itaqui (um total de cinco clones) que posteriormente, foram multiplicados e titulados em células Vero, com títulos em média 10^7 UFP/mL.

6.1.3 – Ensaio de soroneutralização

Uma maneira de avaliar a homogeneidade da população de vírus de uma amostra é através do ensaio sorológico, já que ele reflete as características do genoma viral. Assim a reação de neutralização (NT) foi feita, comparando-se a reatividade cruzada entre o ITQV e seus cinco clones 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) disponível.

As unidades de anticorpos neutralizantes contidas em 0,5 mL de 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 duplicata e os títulos expressos como a média dos resultados.

Todos os cinco 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/mL. Para continuar os estudos com o ITQV, um clone foi aleatoriamente escolhido para dar continuidade aos experimentos propostos, já que os resultados obtidos até aqui se mostraram homogêneos.

6.1.4 - Avaliação da atividade antiviral de IFN do tipo I contra o ITQV em células VERO

As células VERO são comumente usadas para o estudo de IFN, pelo fato de desenvolverem atividade antiviral induzida e, devido a uma deleção cromossômica na região que os codifica, não sendo assim, capazes de serem produzidos após indução com vírus (DIAZ *et al*, 1988). A atividade antiviral, desenvolvida por estas células, foi feita com concentrações variadas dos HuIFN- α 2A e HuIFN- β recombinantes e com desafio após dezoito horas com o ITQV numa m.o.i de 1. O tempo de 18h 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 h.p.i., as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus, através de sua titulação. Os HuIFN- α 2A e HuIFN- β recombinantes testados foram capazes de proteger as células Vero contra ITQV. A partir de 1 UI/mL os dois IFN já foram capazes de proteger as células VERO da infecção pelo ITQV, porém o IFN β com 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 IFN (FIGURA 13). Esses dados são confirmados pela curva de multiplicação do ITQV quando tratado ou não com esses dois IFN do tipo I (FIGURA 14).

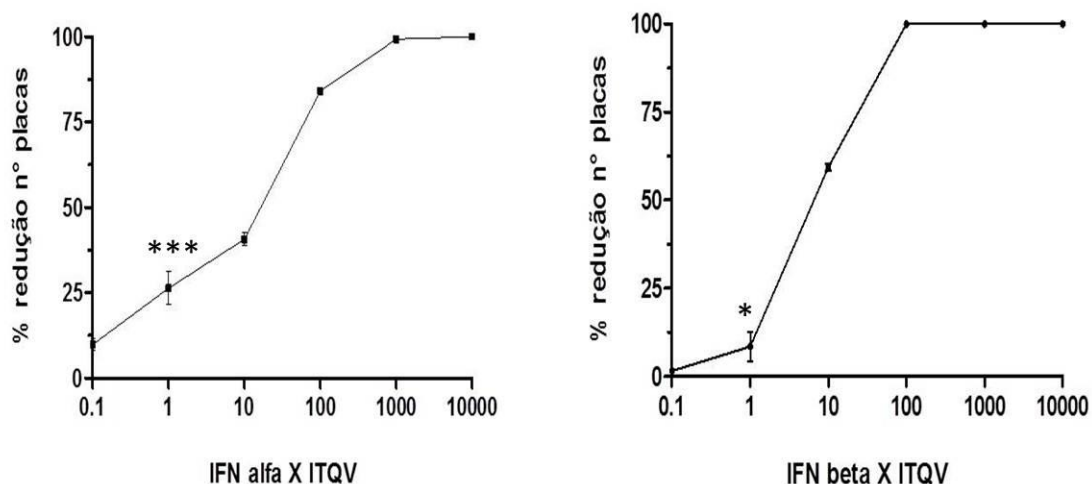


FIGURA 13 - Atividade antiviral do HuIFN- α 2A e HuIFN- β recombinante contra o ITQV. As concentrações de 0,1 a 100 UI/mL foram usadas para o tratamento de células VERO e, 18 horas depois foi feito o desafio com o ITQV numa m.o.i de 1. Aproximadamente 72 h.p.i., as células foram fixadas e coradas com cristal violeta e os valores da curva foram expressos pelo cálculo do percentual de redução de placas do controle de vírus e das células tratadas com os HuIFN. No controle do ITQV foi adicionado às células não tratadas com os IFN. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

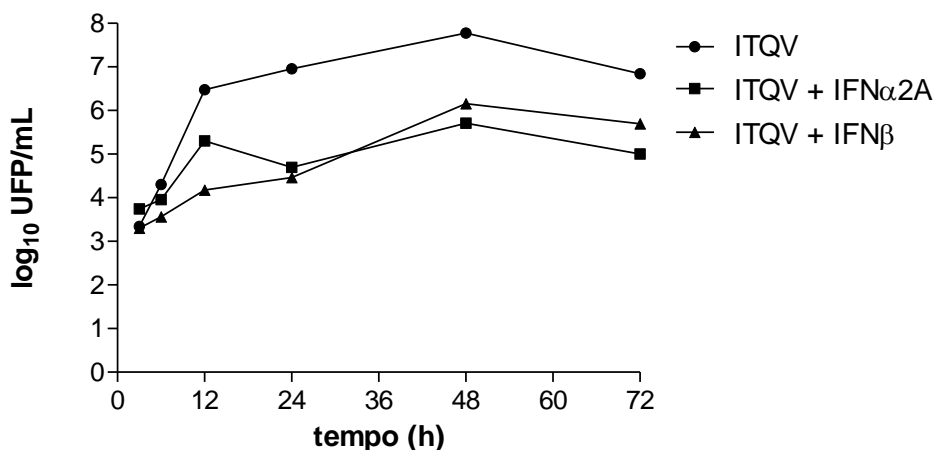


FIGURA 14 – Multiplicação do ITQV em células tratadas com IFN do tipo I, pela medida do vírus produzido no sobrenadante. Células VERO foram tratadas com 100 UI/mL de HuIFN α 2A e HuIFN β , e 18h depois infectadas com o ITQV numa m.o.i de 0,1. Após diferentes tempos, o sobrenadante foi coletado e o título dos vírus no sobrenadante determinado pelo método de Dulbecco e expresso em Log_{10} .

6.1.5 - Atividade antiviral de IFN do tipo III contra o ITQV em células VERO

Os IFN do tipo III possuem vias de sinalização redundantes com os IFN do tipo I e também são induzidos rapidamente após infecções virais. Mas como se ligam a receptores distintos podem mostrar diferenças, entre si, em relação a sua atividade antiviral e a dos outros IFN. A atividade antiviral dos IFN do tipo III, para a maioria dos membros da família *Bunyaviridae* permanece desconhecida, tendo sido descrita para os vírus Caraparu e Apeu pelo Laboratório de Vírus (MAGALHÃES, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2008).

Aa células VERO foram tratadas com diferentes concentrações do HuIFN λ II. O tempo de tratamento escolhido neste caso foi o de 24h, pois dados da literatura indicam este tempo como efetivo para se estabelecer um estado antiviral (ALMEIDA *et al.*, 2008). Aproximadamente 72 h.p.i., as células foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação da quantidade de vírus em cada amostra. Verificamos que apenas em altas concentrações o IFN λ 2 (1000 UI/mL) é capaz de proteger as células da infecção pelo ITQV, sendo que nesta concentração a redução é de aproximadamente 50% das UFP em relação às células não tratadas (FIGURA 15).

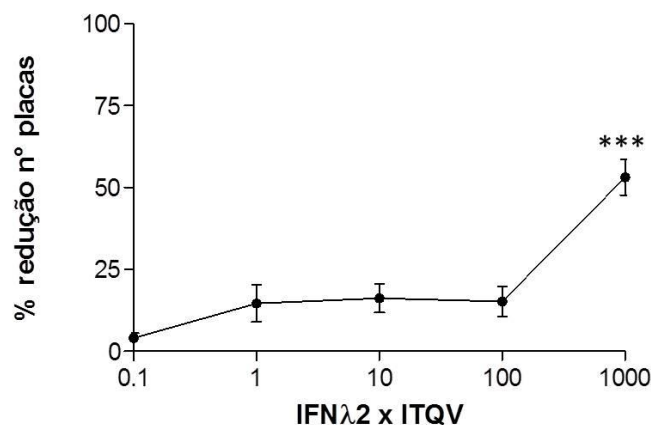


FIGURA 15 - Atividade antiviral do IFN λ 2 contra o ITQV. Diferentes concentrações do IFN λ 2 foram usadas para o tratamento de células VERO e, 24 horas depois infectadas com uma m.o.i de 1 com o ITQV. Aproximadamente 72 h.p.i, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta e os valores da curva foram expressos pelo cálculo do percentual de redução de placas do controle de vírus e das células tratadas com o HuIFN λ 2. No controle de vírus o ITQV foi adicionado às células não tratadas com o IFN λ 2. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

Esses dados são confirmados pela curva de multiplicação do ITQV quando tratado ou não com esses dois IFN do tipo I (FIGURA 16).

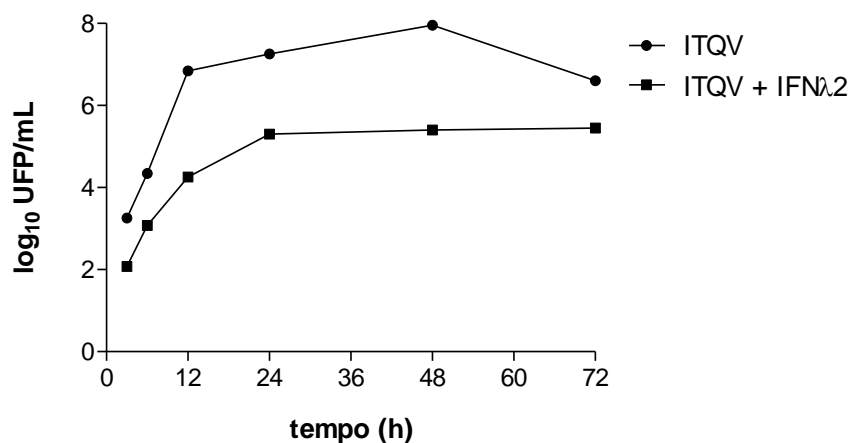


FIGURA 16 - Curva de multiplicação do ITQV em células tratadas com IFN λ 2. Células VERO foram tratadas com 1000 UI/mL de IFN λ 1, e 24 horas depois infectadas com o ITQV numa m.o.i de 1. Após diferentes tempos, o sobrenadante foi coletado e o título dos vírus no sobrenadante determinado pelo método de Dulbecco e expresso em Log₁₀.

6.1.6 – Indução dos ISGs e dos IFN do tipo I e III pelo ITQV

Os interferon tipo III (IFN- λ) são citocinas recentemente descobertas que apresentam efeitos na atividade inata semelhantes aos IFN tipo I. Como já demonstrado pelo Laboratório de vírus (MAGALHÃES, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2008) alguns bunyavírus induzem a expressão dos ISGs e IFN em células A549. Assim, avaliamos a capacidade do ITQV em induzir ISGs e a indução de IFN do tipo I e III, nestas células, pela medida do mRNA, utilizando-se PCR em tempo real.

6.1.6.1 – Níveis de indução dos ISGs MxA, 6-16, 2'5' OAS e PKR

Para melhor caracterizar a atividade dos IFN, PCRs em tempo real foram feitas para se quantificar os níveis de expressão de quatro genes induzidos por IFN ligados à atividade antiviral (MxA, 6-16, 2'5'OAS e PKR) e de IRF7 (fator 7 regulatório de interferon), em células A549 infectadas pelo ITQV em uma m.o.i de 1, nos tempos 6, 12 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 IFN podem induzir a expressão de um grande número de ISGs, levando também ao estabelecimento de um estado antiviral.

A expressão dos quatro ISGs (MxA, 6-16, 2'5'OAS e PKR) e de IRF7, foi aumentada nestas células após infecção pelo ITQV (FIGURA 17). O aumento da expressão de MxA foi detectado desde 6 h.p.i. e níveis basais deste gene foram observados nas células controle (mock), o mesmo pode ser observado para a expressão do ISG 6-16. Já o gene OAS teve sua expressão máxima detectada apenas no tempo de 24 h.p.i.

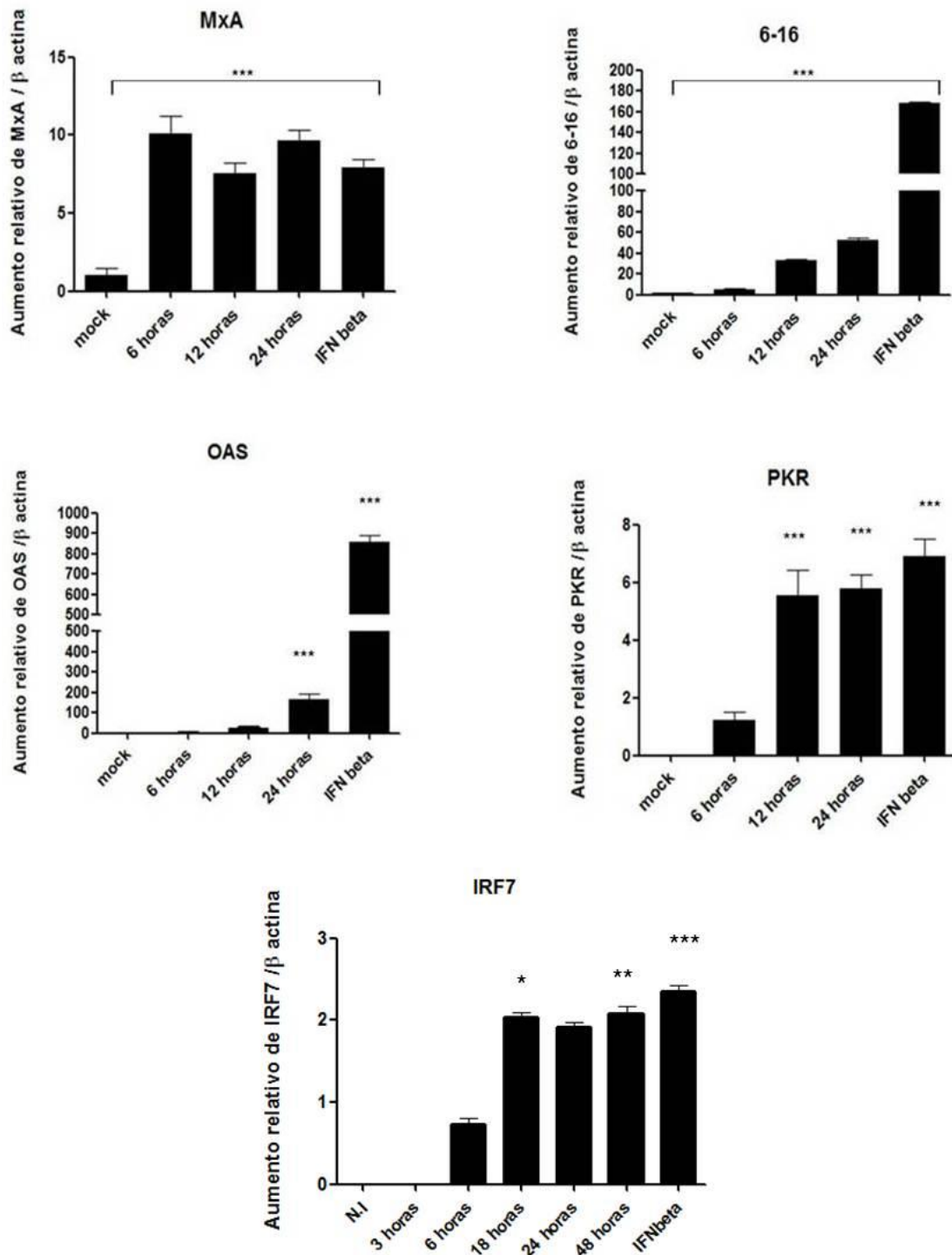


Figura 17 – Níveis de ISG em células A549 após infecção com o ITQV. Células humanas A549 foram infectadas com o ITQV numa m.o.i. de 1. O RNA celular total foi extraído nos tempos 6, 12 e 24 h.p.i. e os níveis de MxA, 6-16, 2'5'OAS e PKR foram medidos por PCR em tempo real. Os valores de ΔC_t de cada 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. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

O gene PKR teve sua expressão aumentada a partir de 12 h.p.i. E por fim, o mRNA do IRF7 teve seu pico de expressão entre 18-24 h.p.i. O RNA das células usadas como controles positivos (células tratadas com IFN- β 1000 UI/mL) e o mock (células não infectadas) foram extraídos no tempo de 24 horas.

6.1.6.2 – Níveis de expressão dos IFN do tipo I e III

Níveis de expressão dos IFN I e III (IFN β , IFN λ 1 e IFN λ 2/3) em células A549 também foram medidos. Para tal, estas células foram infectadas com o ITQV numa m.o.i. de 1, e nos tempos 3, 6, 18, 24 e 48 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 células infectadas com o vírus VSV a uma m.o.i. de 0,01 foram utilizadas como controle positivo.

As reações de PCR em tempo real para os genes dos IFN demonstraram um perfil semelhante de indução na expressão dos três IFN avaliados. A expressão do mRNA de todos os IFN foi detectada de maneira precoce a partir de 3 h.p.i. e seu pico máximo de expressão ocorreu em 24 h.p.i. (FIGURA 18).

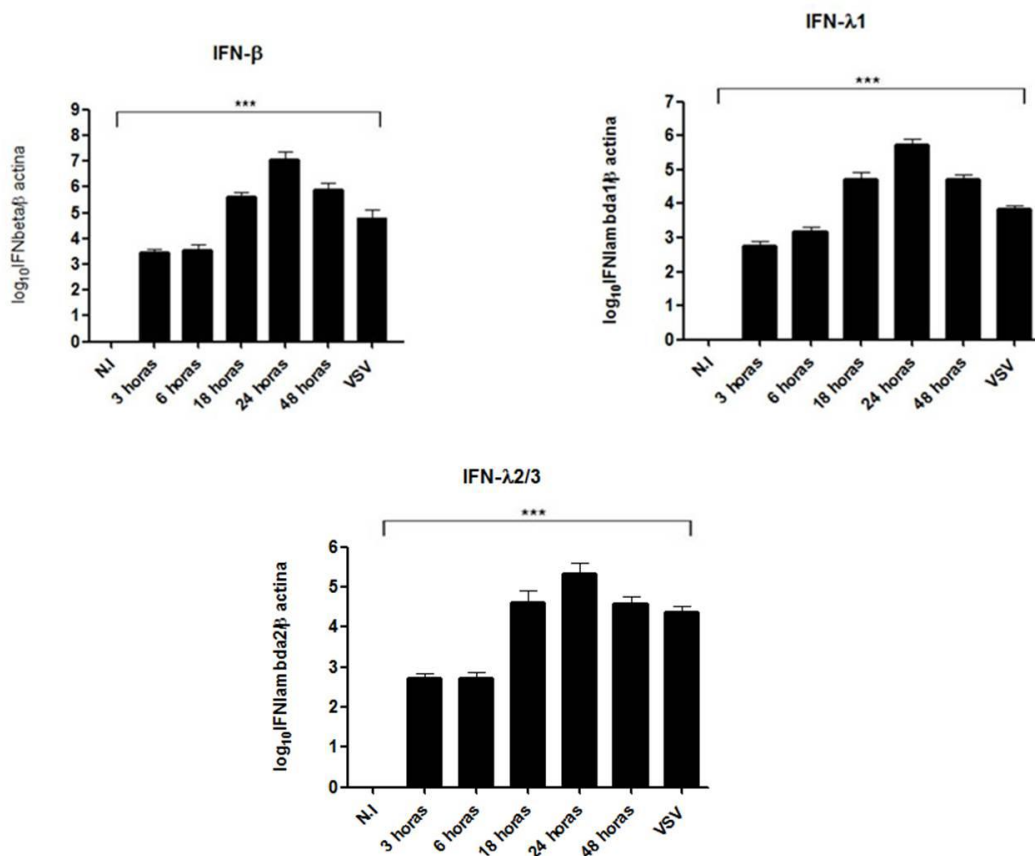


Figura 18 – Níveis de IFN em células A549 após infecção com o ITQV. Células humanas A549 foram infectadas com o ITQV numa m.o.i. de 1, e nos tempos 3, 6, 18, 24 e 48 h.p.i., o RNA total celular foi extraído e os níveis de IFN β , IFN λ 1 e IFN λ 2/3 foram medidos por PCR em tempo real. As reações foram feitas em triplicata, e os valores de Δ Ct de cada amostra foram corrigidos pelo valor do gene constitutivo. O valor 2^{Δ Ct de cada amostra foi calculado e utilizado para construção do gráfico. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

6.1.7 – Infecção de camundongos Balb/c com o ITQV

6.1.7.1 – Infecção de camundongos Balb/c neonatos com o ITQV

A infecção de camundongos Balb/c neonatos com o ITQV foi feita, inicialmente, como o objetivo de determinar a carga viral mais apropriada para avaliar os sinais de doença em camundongos adultos. Além de determinar o título do vírus mais adequado, também houve a preocupação de haver ou não uma relação entre a idade dos animais com a suscetibilidade ao vírus. Assim, após infecção via IC pelo ITQV com diferentes cargas virais, podemos observar que,

nas menores diluições do vírus, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , morreram 100% dos animais em um período de quatro dias após infecção pelo ITQV. Na diluição 10^{-8} sobreviveram 60% dos animais, enquanto que na 10^{-9} sobreviveram 80%. Na maior diluição, 10^{-10} , sobreviveram 100% dos animais ao final do experimento. Os sinais clínicos mais evidentes foram perda de peso, letargia, dificuldade em movimentar e respiração superficial. Os animais controle também foram observados até o 10º dia, sem o aparecimento de sinais clínicos. A DL_{50} foi calculada segundo o método de REED & MUENCH e expressa como $\log 10^{8,2} DL_{50}/0.02mL$ (FIGURA 19).

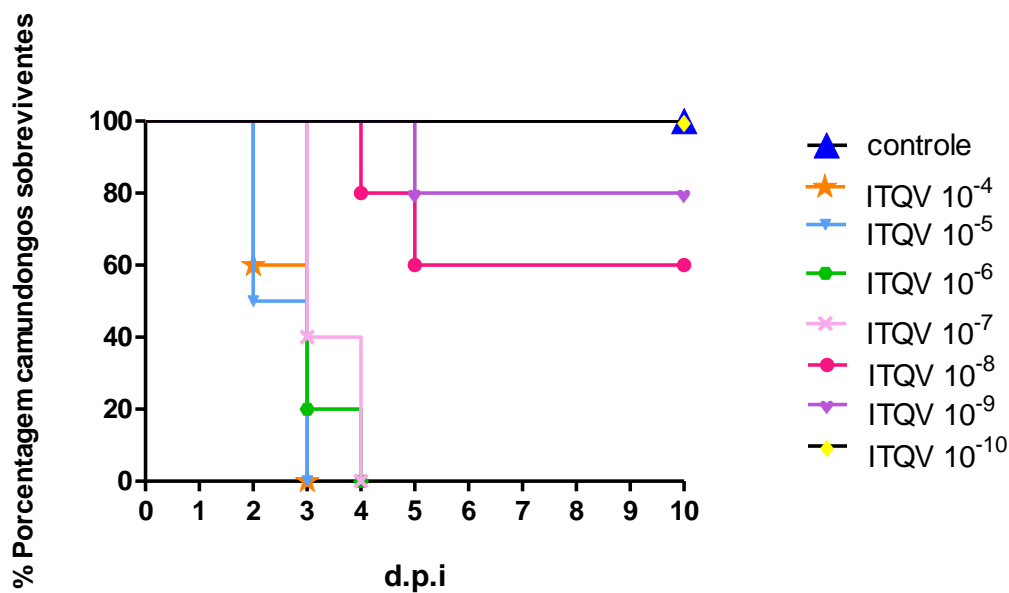


Figura 19 – Sobrevida de camundongos Balb/c neonatos infectados com o ITQV. Camundongos Balb/c, 4-5 semanas, foram infectados via IC com o ITQV (20µL) com diferentes cargas virais e observados em relação à sobrevida por um período de 10 dias.

6.1.7.2 – Infecção de camundongos Balb/c adultos com o ITQV via SC

Após avaliar a infecção pelo ITQV em animais neonatos, o passo seguinte foi avaliar a infecção em animais adultos jovens, cujo sistema imune já está bem desenvolvido. Assim, após infecção via SC pelo ITQV com diferentes cargas virais, a porcentagem de sobrevivência dos animais foi de 100% para todas as doses testadas. Os animais infectados por esta via com o ITQV foram

resistentes à infecção e não apresentaram qualquer sinal clínico de doença. Estes animais foram pesados em intervalos de 2 dias, por 14 dias. Todos os animais infectados não apresentaram perda de peso estatisticamente significativa, em todas as doses utilizadas em comparação aos animais controle e aos animais não infectados. A evolução do peso foi semelhante para nos animais controle ou não infectados.

Para a avaliação da patogênese, foram retirados o fígado, baço e rins destes animais para o isolamento do vírus e análises histopatológicas. Não houve isolamento de vírus em nenhum dos órgãos analisados. Porém, alterações macroscópicas foram evidentes no fígado de todos os animais infectados, quando comparados com animais controle. Tais alterações foram palidez do órgão e aumento do seu tamanho (dados não mostrados). No baço e rins dos animais infectados, não foi verificada nenhuma alteração macroscópica (dados não mostrados).

As análises histopatológicas apresentadas, do fígado, foram representativas de tecidos coletados de, pelo menos, 5 animais. Os exames histopatológicos dos animais infectados com o ITQV (10^5 PFU) mostraram raros linfócitos portais, parênquima com infiltrado inflamatório de atividade discreta e focal além de alterações discretas de hepatócitos, infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose. A arquitetura hepática lobular ficou completamente preservada, em todos os animais infectados no 15º dia p.i. (FIGURA 20).

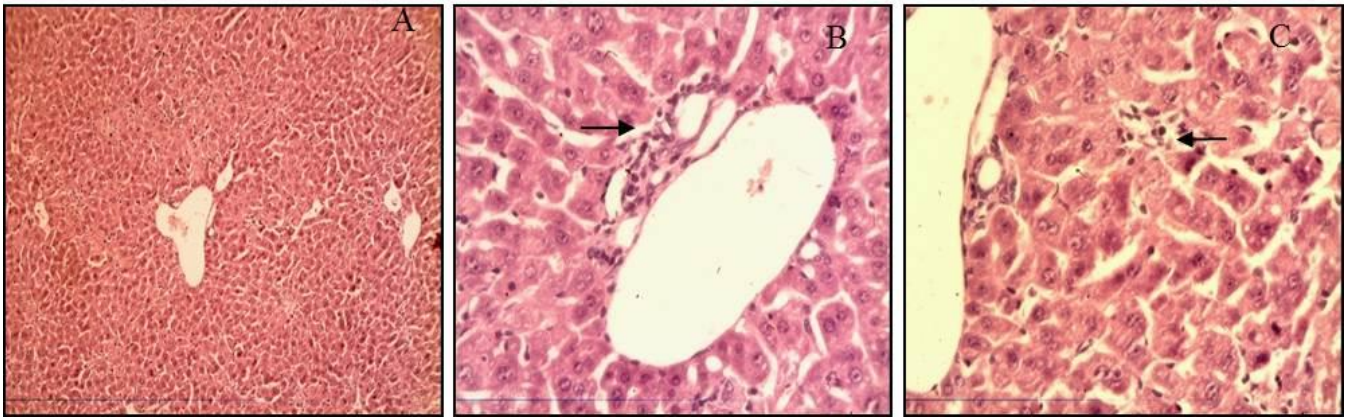


Figura 20 – Aspectos histopatológicos de parênquima hepático de camundongos Balb/c adultos (4-5 semanas) infectados com ITQV via SC Arquitetura hepática lobular totalmente preservada em todos os animais infectados pelo ITQV com 10^5 PFU no 15º dia p.i. (A, B, C). Raros linfócitos portais (B - seta), parênquima com infiltrado inflamatório de atividade discreta e focal (C – seta). Alterações discretas de hepatócitos, infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose (não documentado) no 15º dia d.p.i. Aumento original: 100X (A) e 400X (B e C).

6.1.7.2.1 –Ensaio de soroneutralização

Para avaliar a resposta humoral desencadeada pela infecção com o ITQV, os camundongos adultos jovens, infectados pelo ITQV pela via SC tiveram o soro coletado 15 d.p.i. para dosagem dos títulos de anticorpos neutralizantes. Para todos os animais infectados, uma resposta humoral efetiva foi observada, demonstrado pelos altos títulos de anticorpos neutralizantes detectados. Podemos observar também que uma maior quantidade de vírus (10^5 PFU) acarretou um aumento, estatisticamente significativo, no título de anticorpos neutralizantes anti-ITQV quando comparado às doses de 10^3 e 10^4 PFU. (FIGURA 21).

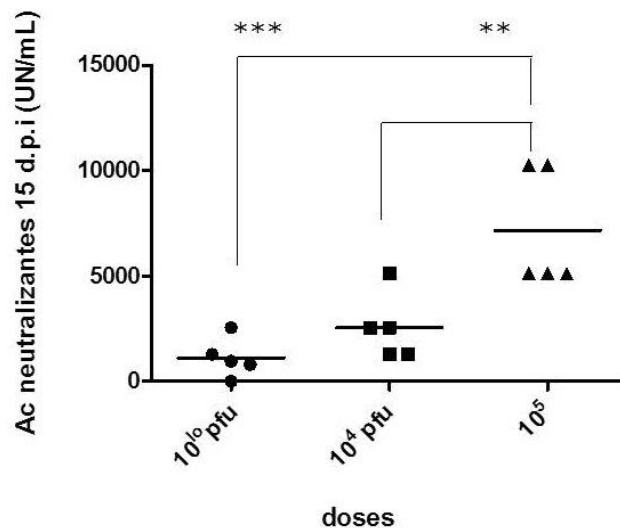


Figura 21 – Título de Ac neutralizantes anti-ITQV no soro dos animais infectados via SC. O soro dos animais obtido aos 15 d.p.i. foi utilizado em ensaio de soroneutralização em células Vero. Os resultados foram expressos como a recíproca da diluição do soro em que houve uma redução de 50% do ECP. Em cada título de vírus utilizado, os soros de 5 animais foram testados em duplicata, sendo os valores representados, a média dos resultados. Um maior título viral quando utilizado (10^5 PFU) acarretou em um aumento estatisticamente significativo no título de anticorpos neutralizantes anti-Itaqui, quando comparado aos títulos de 10^3 e 10^4 PFU. (Teste One-Way ANOVA).

6.1.7.2.2 – Isolamento do vírus ITQV e indução de IFN

Animais adultos jovens (4-5 semanas) foram infectados via SC (10^5 UFP) com o ITQV. A atividade antiviral foi medida pela titulação do IFN nos soros desses animais, que foram coletados nos tempos de 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 h.p.i. através do seio retro-orbital (FIGURA 22). Além disso, uma alíquota dos soros foi utilizada para determinação da viremia.

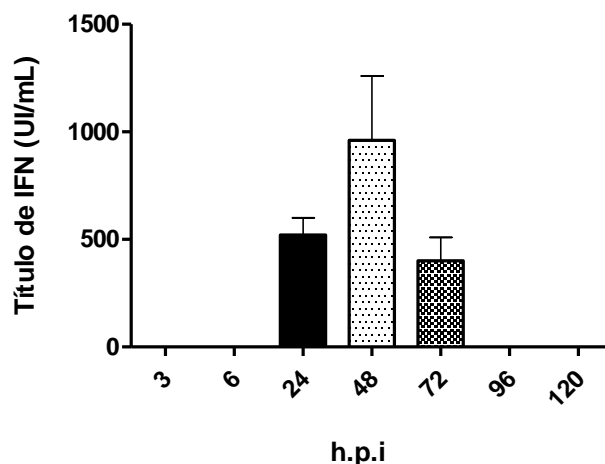


Figura 22 – Título de IFN no soro de camundongos Balb/c (4-5 semanas) infectados com o ITQV, via SC. Títulos de IFN foram determinados em soro de animais infectados com o ITQV, coletados em diferentes tempos pós-infecção através do ensaio de titulação de IFN em células L929. A presença do IFN foi detectada pela inibição da infecção destas células pelo vírus EMC.

O vírus foi isolado, através da titulação por contagem das unidades formadoras de placa (UFP), dos soros dos animais infectados pela via SC, nos tempos pós-infecção de 24, 48, 72 e 96 h.p.i. As titulações foram feitas de soros de 5 animais infectados e 1 animal controle para cada tempo. No soro dos animais controle, o vírus não foi detectado. O título do vírus não foi calculado em razão do número de placas terem sido inferior a 30, mesmo na menor diluição (10^{-1}).

6.1.7.2.3 – Dosagem de enzimas hepáticas

Níveis de alanina transaminase (ALT) e de aspartato transaminase (AST) hepáticas foram medidas no soro dos animais infectados com o ITQV, pois são indicadoras de dano hepático (FIGURA 23). Um aumento dessas enzimas indica graves danos no fígado, muito comuns após infecção por arbovírus, que possuem este órgão como um dos órgãos alvo para sua multiplicação.

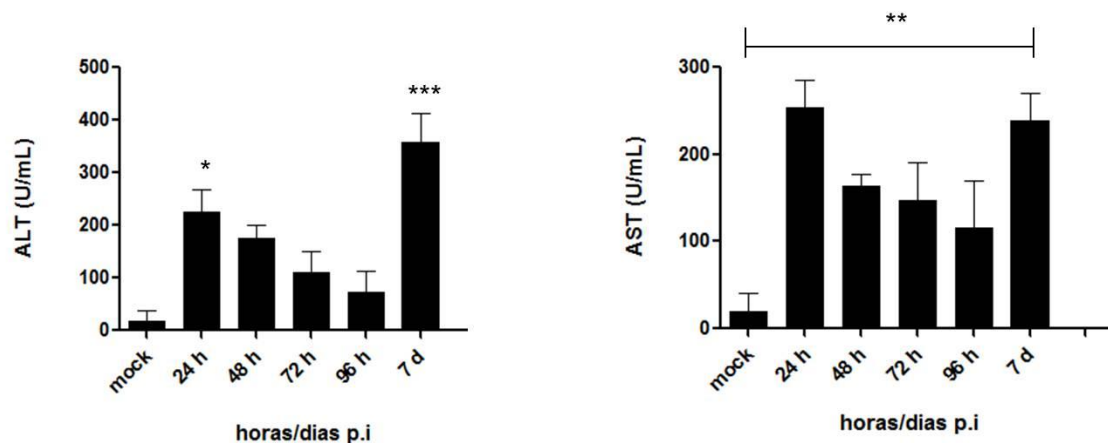


Figura 23 – Níveis de alanina transaminase (ALT) e de aspartato transaminase (AST) em U/L do soro de camundongos Balb/c infectados com o ITQV via SC. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o ITQV 10^5 PFU e tiveram o soro coletado em diferentes tempos pós-infecção. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

6.1.7.2.4 – Cinética de expressão de citocinas e quimiocinas

Altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias tem sido descritas em modelos murinos após infecção por diversos arbovírus. Assim, para avaliar o perfil de citocinas em camundongos Balb/c infectados pelo ITQV, o fígado dos animais infectados foram utilizados para quantificar a expressão de diferentes citocinas e quimiocinas através de PCR em tempo real. Como controle foram utilizados fígado de animais inoculados com sobrenadante de células VERO.

Todas as citocinas analisadas no fígado dos animais infectados com 10^5 PFU do ITQV apresentaram um aumento relativo de sua expressão quando comparado aos controles não infectados. IFNG, IFNB e IL1B tiveram seu pico máximo de expressão às 24 d.p.i. apresentando logo após este tempo uma diminuição progressiva de indução. IL6 por sua vez, teve pico máximo de expressão em 48 h.p.i., com aumento progressivo significativo de indução até 96 h.p.i. TNFA e NOS2 tiveram sua expressão máxima em 96 h.p.i. (FIGURA 24).

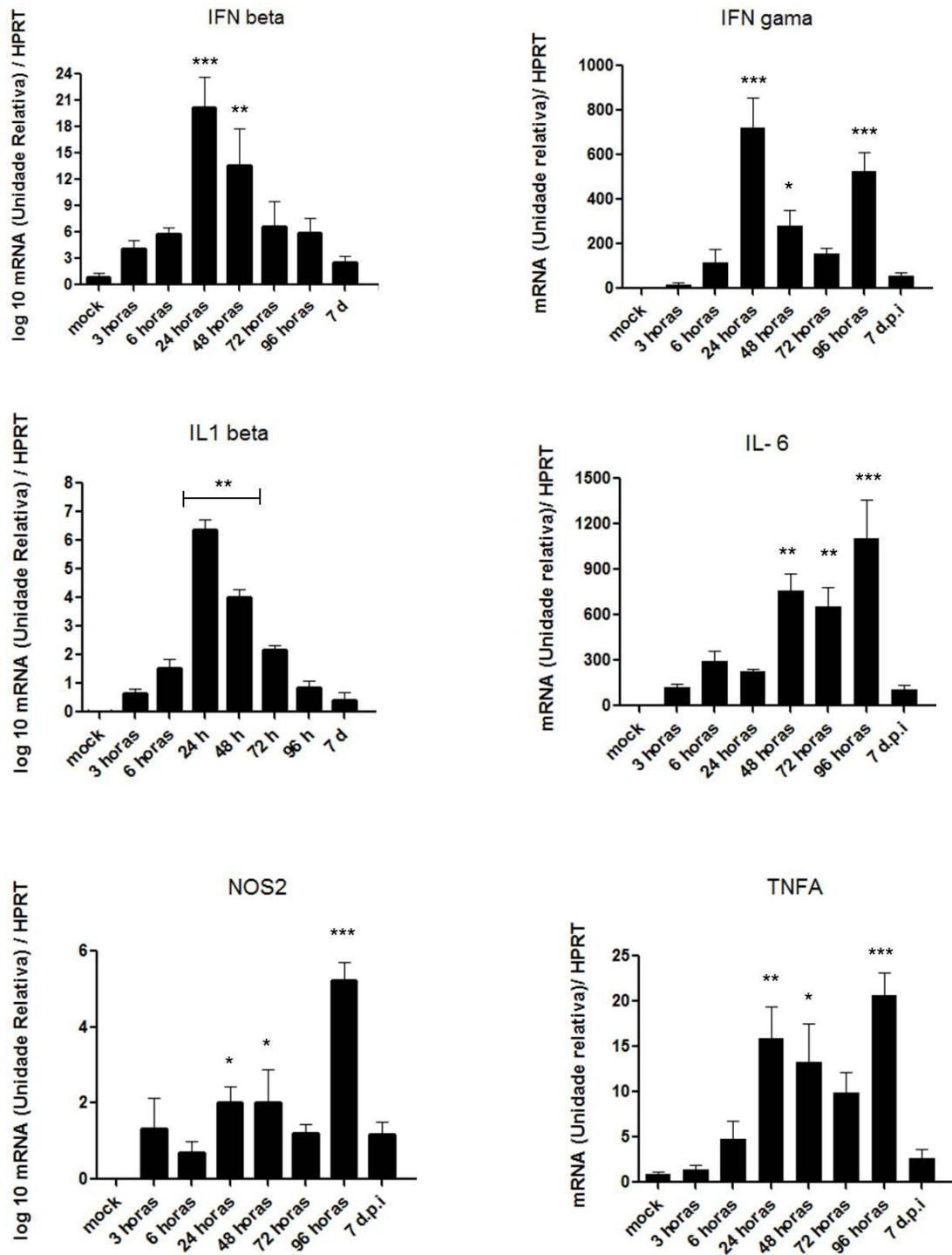


Figura 24 – Cinética de expressão de transcritos de IFNB (IFN beta), IFNG (IFN gama), IL1B (IL-1 beta), IL6 (IL-6), NOS2 e TNFA (TNF alfa) em fígado de camundongos Balb/c infectados com o ITQV em avaliação feita por PCR em tempo real. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o ITQV 10^5 PFU via SC e tiveram o fígado coletados em diferentes tempos pós-infecção. Animais não infectados foram inoculados com sobrenadante de células VERO. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi feita a PCR em tempo real em duplicata, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação á expressão do gene constitutivo HPRT. A análise foi feita pelo método da curva padrão. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos () correspondem á $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.**

Com relação às quimiocinas avaliadas quanto à indução de mRNA podemos observar que, todas apresentaram perfil semelhante de indução a partir de 24 h.p.i. e pico máximo observado no 7º d.p.i. (FIGURA 25).

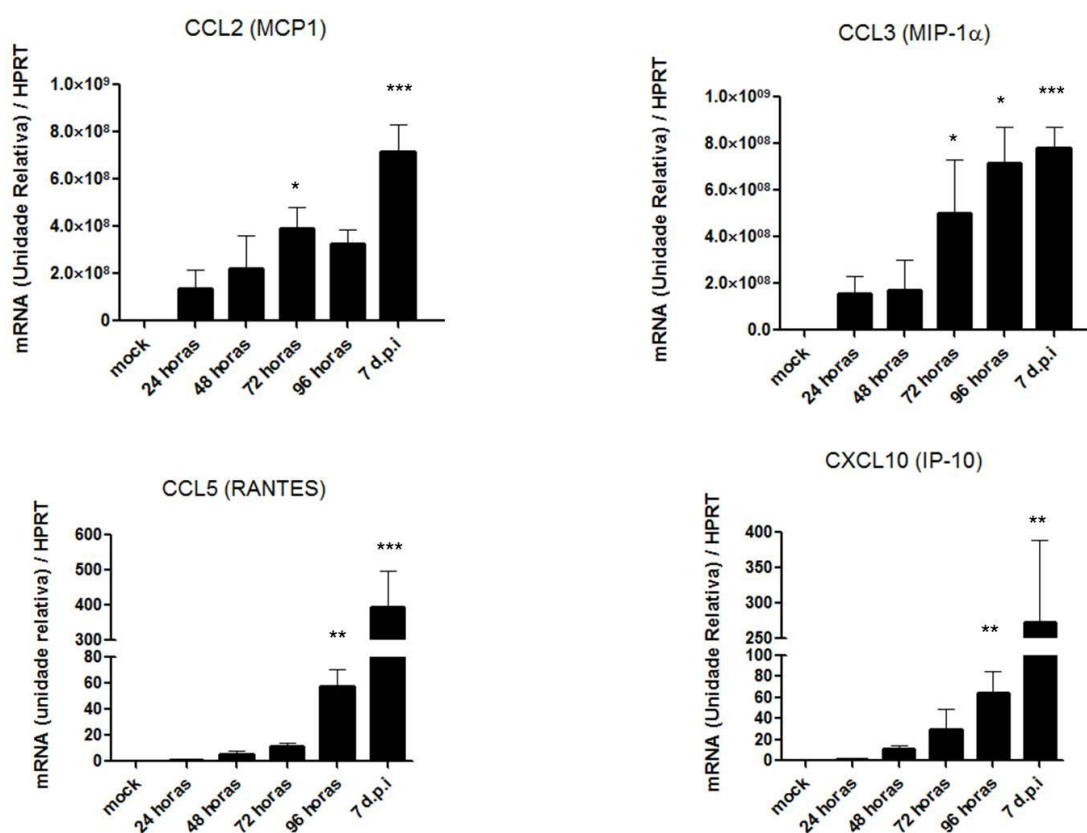


Figura 25 – Cinética de expressão de transcritos de quimioquina (motivoC-C) ligante 2 (CCL2 ou MCP1), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES) e quimioquina (motivoCXC)ligante 10 (CXCL10 ou IP-10) em fígado de camundongos Balb/c infectados com o ITQV por PCR em tempo real. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o ITQV 10⁵ PFU via SC e tiveram o fígado coletados em diferentes tempos pós-infecção. Animais não infectados foram inoculados com sobrenadante de células VERO. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi feita a PCR em tempo real em duplicata, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação à expressão do gene constitutivo HPRT. A análise foi feita pelo método da curva padrão. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à p < 0,05; dois asteriscos (**) correspondem à p < 0,01 e três asteriscos (***) correspondem à p < 0,001.

6.2 – Caracterização CARV (BeAn 3994)

O laboratório de Vírus tem feitos esforços para a caracterização dos *Orthobunyavirus* do Grupo C por ter encontrado características diferentes na resposta do interferon a estes vírus. A classificação sorológica dos vírus do grupo C, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV)

(2005), apregoa que o complexo antigênico do vírus Caraparu compreendem os vírus Caraparu BeAn3994 (CARV), Bruconha (BRUV), Apeu BeAn849 (APEUV), Ossa BT 1820 (OSSAV) e Vinces 75V-807 (VINV), enquanto que complexo antigênico do vírus Oriboca compreende os vírus Oriboca BeAn17 (ORIV) e o Itaqui BeAn17 (ITQV). Os dados de sequenciamento do gene que codifica para a polimerase (segmento L) indicam que os vírus Caraparu e Apeu são distintos e o Itaqui assemelha-se ao Caraparu (Carla Amaral Pinto, tese de doutorado em andamento). Estes dados se contrapõe à classificação do ICTV, baseada nos segmentos M e S, porém os dados de sequenciamento indicam que estes vírus são, pelo menos, rearranjos. Estas variações apresentadas podem estar ligadas a virulência e por isso, após avaliar a infecção pelo ITQV em animais neonatos e adultos jovens, o passo seguinte foi avaliar também o curso da infecção pelo CARV.

6.2.1 – Infecção de camundongos Balb/c neonatos com o CARV

A infecção de camundongos Balb/c neonatos com o CARV também foi feita com objetivo de determinar a carga viral mais apropriada para se avaliar os sinais de doença pelo CARV em camundongos adultos e determinar assim o título viral, além de avaliar uma relação da idade dos animais com a susceptibilidade ao vírus.

Assim, após infecção via IC pelo CARV com diferentes cargas virais, podemos observar que, nas menores diluições do vírus, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , morreram 100% dos animais em um período de 4 dias após infecção pelo CARV. Na diluição 10^{-8} sobreviveram 40% dos animais, enquanto que na 10^{-9} sobreviveram 60%. Na maior diluição, 10^{-10} , sobreviveram 100% dos animais ao final do experimento. Os sinais clínicos mais evidentes foram perda de peso, letargia, dificuldade em movimentar e respiração superficial. Os animais controle também foram observados até o 10º dia, sem o aparecimento de sinais clínicos. A DL_{50} foi calculada segundo o método de REED & MUENCH e expressa como $\log 10^9 DL_{50}/0.02mL$ (FIGURA 26).

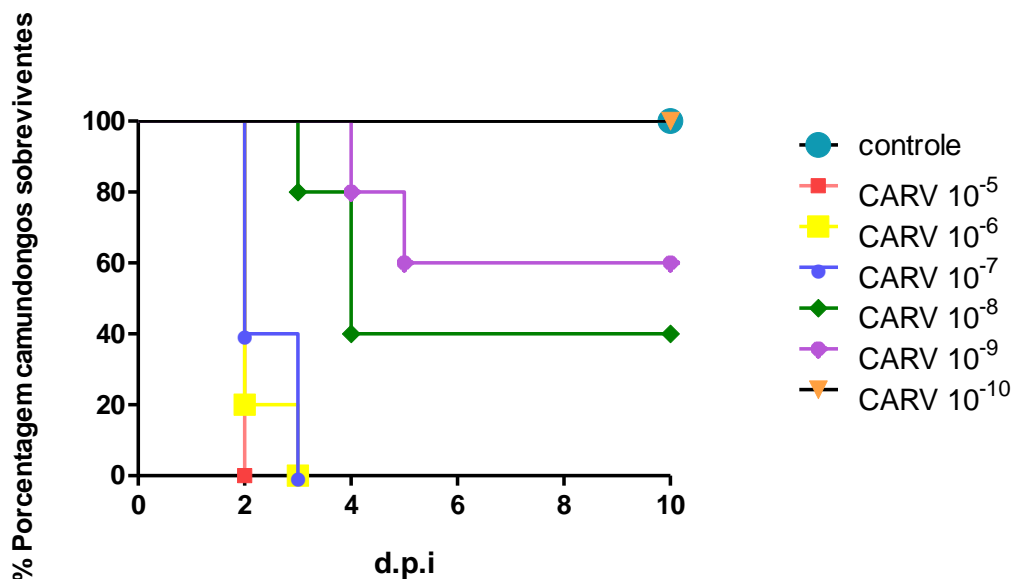


Figura 26 – Sobrevida de camundongos Balb/c neonatos infectados com o CARV. Camundongos Balb/c, 4-5 semanas, foram infectados via IC com o CARV (20µL) com diferentes cargas virais e observados em relação à sobrevida por um período de 10 dias.

6.2.2 – Infecção de camundongos Balb/c adultos com o CARV via SC

Após infecção via SC pelo CARV com 10⁵ PFU, podemos observar que, no sétimo dia pós-infecção a porcentagem de sobrevivência foi de aproximadamente 66% e no décimo sétimo dia pós-infecção a porcentagem de sobrevivência dos animais foi de 50% (FIGURA 27). No décimo oitavo dia pós-infecção todos os animais tiveram que sofrer eutanásia devido à acentuada perda de peso que foi superior a 20% do peso corporal inicial dos animais o que é preconizado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA), o qual foi submetido este trabalho. Os animais infectados por esta via com o CARV foram pesados em intervalos de 2 dias, por 17 dias (FIGURA 28).

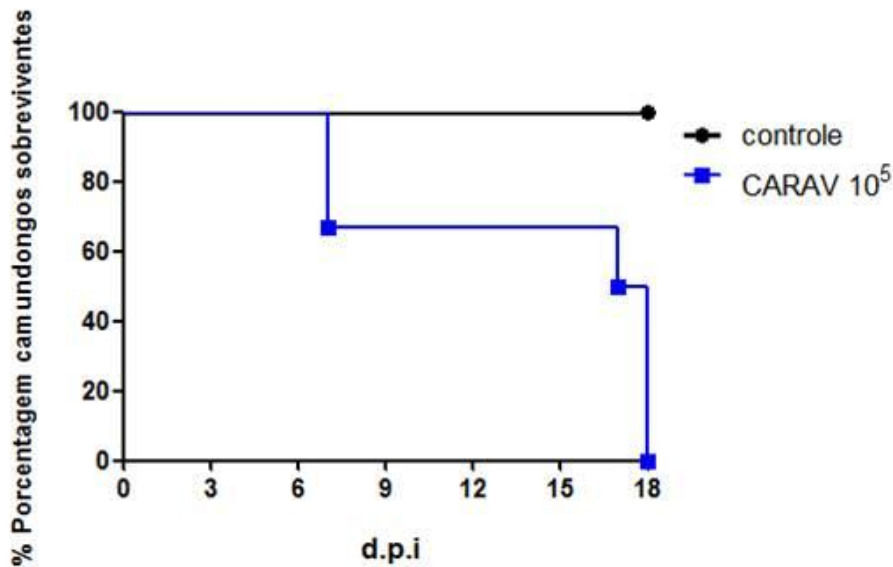


Figura 27 – Sobrevida de camundongos Balb/c adultos jovens infectados com o CARV. Camundongos Balb/c, 4-5 semanas, foram infectados por via SC com o CARAV (10^5 PFU) e observados em relação à sobrevida por um período de 18 dias.

Os animais infectados apresentaram perda de peso estatisticamente significativa a partir do nono dia quando comparado aos animais controle (FIGURA 29).

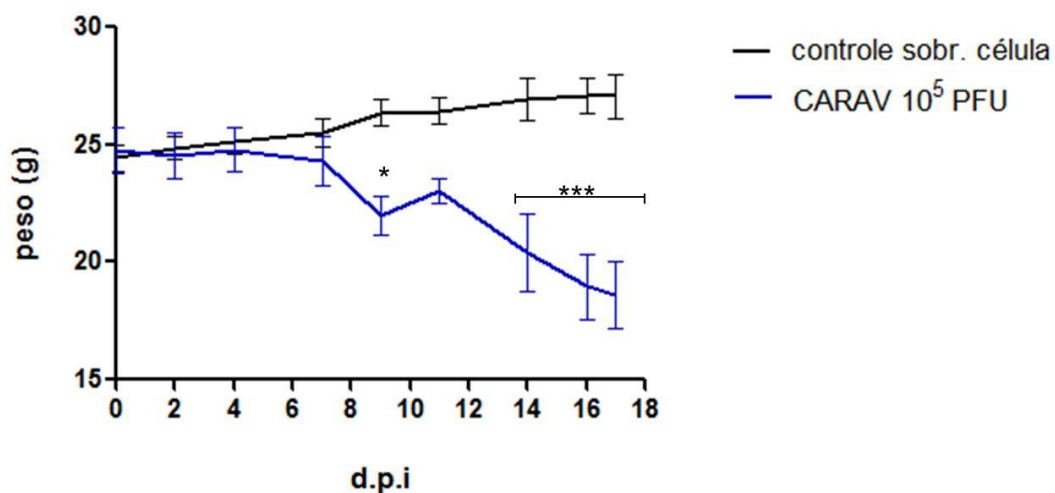


FIGURA 28 – Evolução do peso de camundongos Balb/c adultos infectados com o CARV por via SC. Animais foram infectados com uma dose de 10^5 PFU com o vírus CARV. Os animais foram pesados em intervalos de 2 dias, por 17 dias. Os dados foram analisados utilizando-se o teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

No décimo sexto dia pós-infecção os animais começaram a apresentar sinais clínicos de doença como pilo-ereção e arqueamento de dorso (FIGURA 29) e no décimo sétimo dia os animais continuaram a apresentar estes mesmos sinais clínicos descritos acima, porém apresentavam também um intenso edema facial e respiração superficial e cianose das patas traseiras (dado não mostrado).

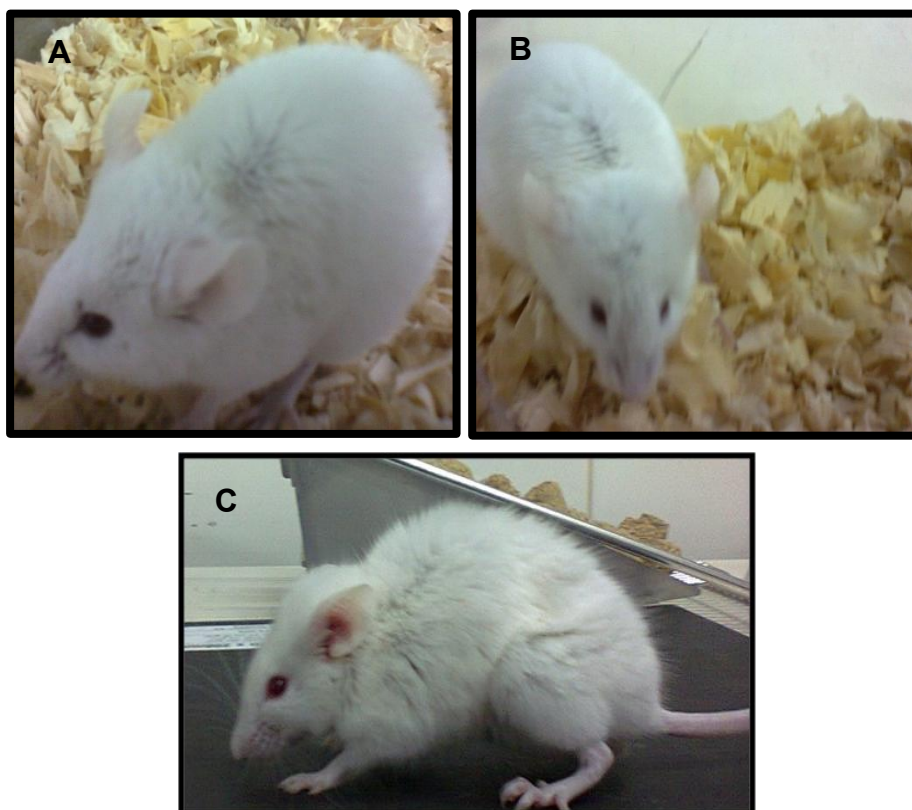


FIGURA 29 – Camundongos Balb/c infectados com o CARV. Animais foram infectados com 10^5 PFU com o vírus CARV A e B) animal apresentando edema facial. C) animal apresentando arqueamento de dorso e pilo-ereção.

Foram coletados também destes animais infectados com o CARV fígado, baço e rins para a determinação do título viral e demais experimentos. Os animais que por ventura morreram após a infecção foram rapidamente processados. Alterações macroscópicas foram evidentes no fígado e baço de todos os animais infectados, quando comparados com animais controle. Tais alterações foram palidez do fígado e aumento do fígado e baço (FIGURA 30).

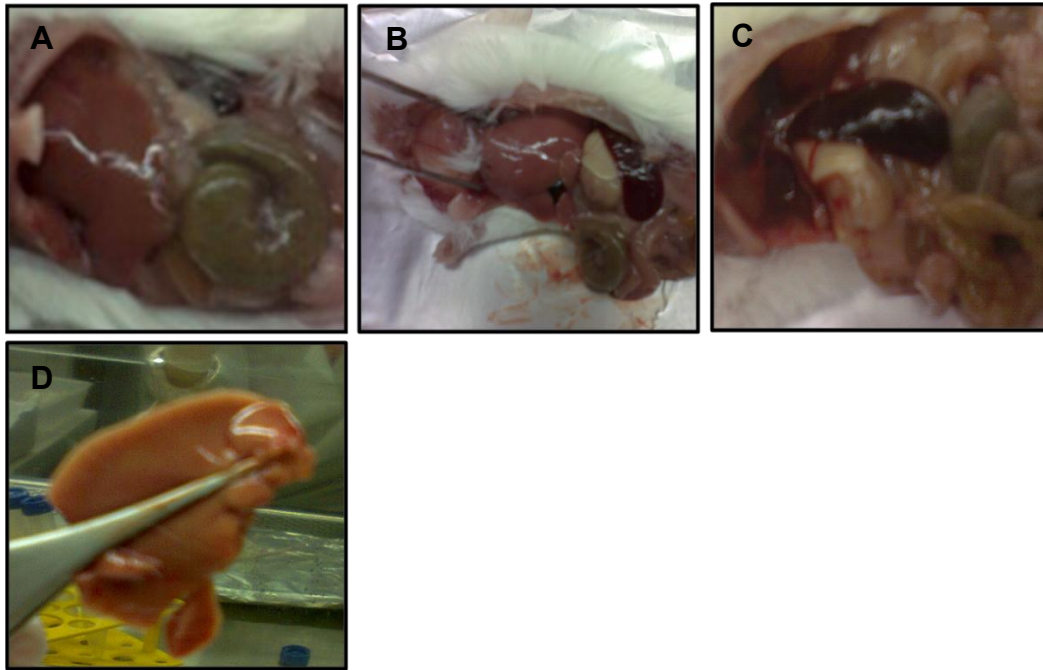


FIGURA 30 – Fígado e baço de camundongos Balb/c infectados com o CARV. Animais foram infectados com uma dose de 10^5 PFU com o vírus CARV A, B e C) abertura do peritônio e exposição do fígado e baço apresentando um aumento em seu tamanho. D) fígado do animal apresentando palidez.

Dos três órgãos analisados foi possível isolar o vírus apenas do fígado dos animais infectados com o CARV via SC (FIGURA 31).

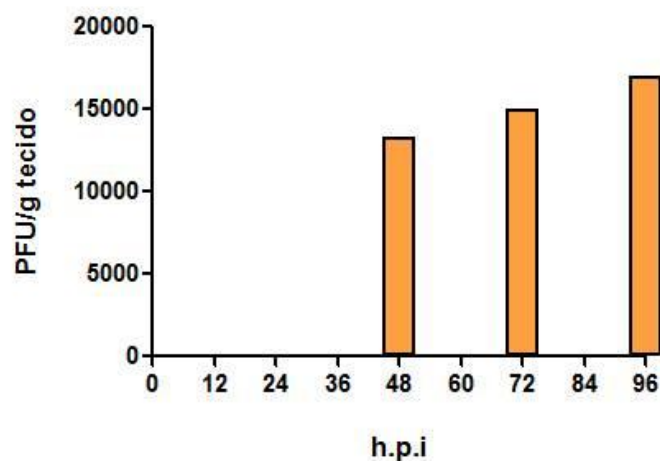


FIGURA 31 – Presença do vírus no fígado dos camundongos Balb/c infectados com o CARV. O fígado dos animais infectados foi pesado e então macerado em DMEM 5% SFB. A titulação foi feita em células Vero e o título expresso em PFU/g tecido.

As análises histopatológicas feitas no fígado destes animais foram representativas de tecidos coletados de pelo menos, 5 animais por grupo.

Exames histopatológicos do fígado dos animais infectados com o CARV demonstraram que a arquitetura hepática lobular está totalmente preservada em todos os animais infectados (FIGURA 32).

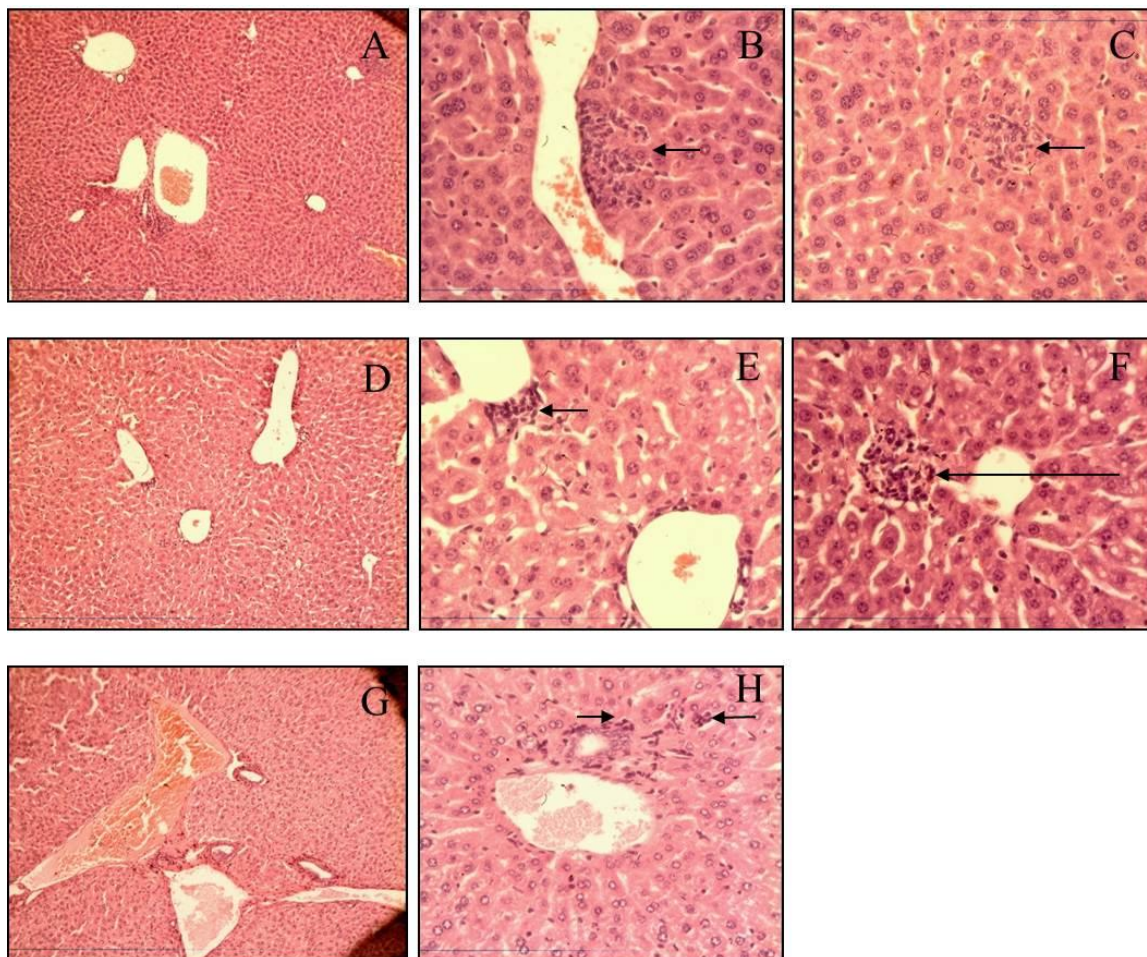


Figura 32 – Aspectos histopatológicos de parênquima hepático de camundongos Balb/c adultos (4-5 semanas) infectados com CARV via SC. Arquitetura hepática lobular totalmente preservada em todos os animais infectados pelo CARV às 48 d.p.i. (A, B, C), no 7º d.p.i. (D, E e F) e no 18º d.p.i. (Z, G e H). Infiltrado inflamatório portal com linfocitose discreta (B - seta), parênquima com infiltrado inflamatório (C - seta) e necrose focal em vários sítios (não documentado) às 48 h.p.i. Raros linfócitos portais (E - seta), parênquima com infiltrado inflamatório linfo-histiocitário discreto e focal (F - seta), alterações discretas de hepatócitos e raros focos de necrose (não documentado) aos 7 e 18 d.p.i. Aumento original: 100X (A, D e G) e 400X (B, C, E, F e H).

Após 48 horas de infecção com o CARV observamos um infiltrado inflamatório portal, com linfocitose discreta. O parênquima também apresentou um infiltrado inflamatório e necrose em vários sítios (não mostrado). O mesmo foi observado no sétimo dia pós-infecção. No 18º d.p.i. de infecção foram observados raros

linfócitos portais, parênquima com infiltrado inflamatório de atividade discreta e focal, além de alterações discretas dos hepatócitos, infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose (não mostrado).

6.2.2.1 – Ensaio de soroneutralização

Para avaliar a resposta humoral desencadeada pela infecção com o CARV, os camundongos adultos jovens, infectados pelo CARV via SC tiveram o soro coletado em diferentes d.p.i. para dosagem dos títulos de anticorpos neutralizantes. Para todos os animais infectados, uma resposta humoral efetiva foi observada, demonstrado pelos altos títulos de anticorpos neutralizantes detectados (FIGURA 33).

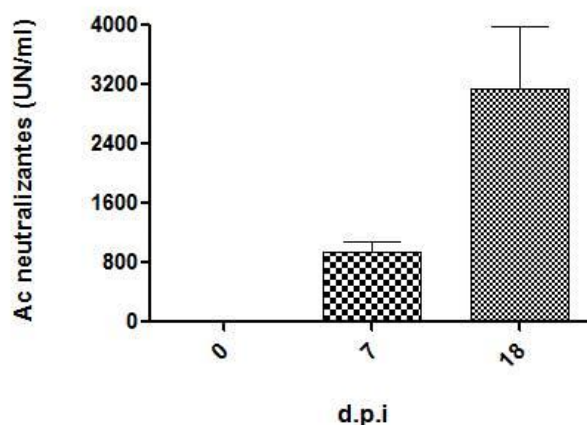


Figura 33 – Título de Ac neutralizantes anti-CARV no soro dos animais infectados via SC.

O soro dos animais obtido em diferentes tempos pós-infecção foi utilizado em ensaio de soroneutralização em células Vero. Os resultados foram expressos como a recíproca da diluição do soro em que houve uma redução de 50% do ECP. Em cada dose, os soros de 5 animais foram testados em duplicata, sendo os valores representados, a média dos resultados.

6.2.2.2 – Isolamento do vírus CARV e indução do IFN

Animais adultos jovens (4-5 semanas) foram infectados via SC (10^5 UFP) com o CARV. A atividade antiviral foi medida pela titulação do IFN nos soros desses animais que foram coletados nos tempos de 3, 6, 24, 48, 72, 96 horas e também no sétimo e décimo oitavo dia pós-infecção. (FIGURA 34). Além disso, uma alíquota dos soros foi utilizada para determinação da viremia.

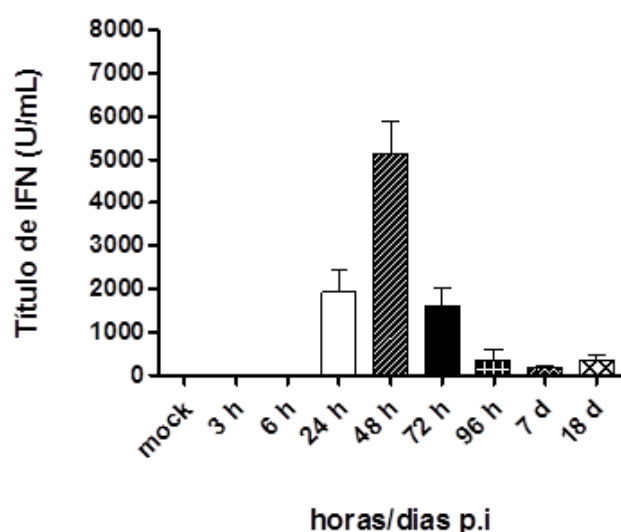


Figura 34 – Título de IFN no soro de camundongos Balb/c (4-5 semanas) infectados com o CARV, via SC. Títulos de IFN foram determinados em soro de animais infectados com o CARAV, coletados em diferentes tempos pós-infecção através do ensaio de titulação de IFN em células L929. A presença do IFN foi detectada pela inibição da infecção destas células pelo vírus EMC.

O vírus foi isolado, através da titulação por contagem das unidades formadoras de placa (UFP), dos soros dos animais infectados pela via SC, nos tempos pós-infecção de 24, 48, 72 e 96 h.p.i. As titulações foram feitas dos soros de 5 animais infectados e 1 animal controle para cada tempo. No soro dos animais controle, o vírus não foi detectado. O título do vírus não foi calculado devido ao número de placas ter sido inferior a 30, mesmo na menor diluição (10^{-1}).

6.2.2.3 – Detecção de vírus em animais infectados pela Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção do vírus em animais infectados, via SC, foi feita no soro, fígado, baço e rins pela medida do RNA do vírus CARV. Para avaliar a presença de RNA viral no soro dos animais infectados com o CARV via SC foi feita uma reação de PCR convencional utilizando-se para isso, um par de primer que amplifica um segmento de 265 pb do segmento L deste vírus (item 5.8.4.4).

Os animais foram anestesiados, eutanasiados e o sangue coletado através da punção cardíaca. Tal material foi submetido à extração de RNA (kit RNeasy Mini QIAGEN) e subsequente tratamento com DNase para posterior transcrição reversa. O controle positivo foi utilizado o cDNA obtido de amostras do CARV e como controle negativo o cDNA obtido de soro de animais infectados com sobrenadante de células VERO.

Foi possível detectar a presença de RNA viral no soro dos animais infectados nos tempos de 48, 72 e 96 horas pós-infecção (FIGURA 35).

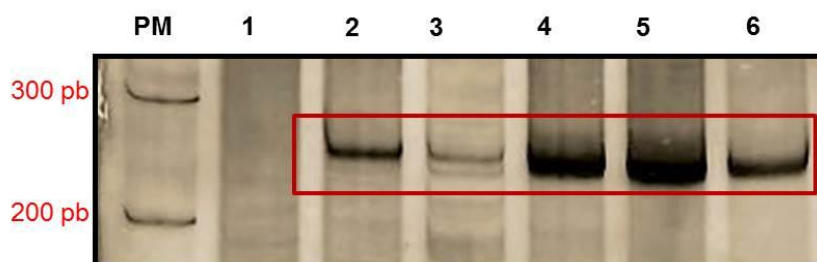


Figura 35 – Detecção de RNA no sangue de camundongos Balb/c infectados com o CARV via SC em avaliação feita por PCR para o segmento L deste vírus. Grupos de camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU e tiveram sangue coletados em diferentes tempos pós-infecção. DNA obtido após PCR e submetido à eletroforese em gel de poli-acrilamida 8% e corado com nitrato de prata Canaletas: PM – padrão de tamanho molecular (ladder de 100 pb); 1 – controle negativo da reação (animal controle); 2 – controle positivo do CARV; 3 – soro 24 h.p.i.; 4 – soro 48 h.p.i.; 5 – soro 72 h.p.i.; 6 - soro 96 h.p.i.

A avaliação da presença de RNA viral em diferentes órgãos dos animais infectados via SC pelo CARV e sua possível disseminação, foi feita uma reação de PCR convencional utilizando-se o mesmo par de primer utilizado acima.

Os animais foram anestesiados, eutanasiados e os órgãos coletados. Nestes órgãos foi feita a extração de RNA (Trizol kit RNeasy Mini QIAGEN) e subsequente tratamento com DNase para posterior transcrição reversa. O controle negativo utilizado foi o cDNA obtido do fígado de animais infectados com sobrenadante de células VERO. O produto de PCR indicativo da presença do RNA do vírus foi encontrado apenas no fígado dos animais infectados nos tempos de 48, 72 e 96 horas pós-infecção (FIGURA 36).

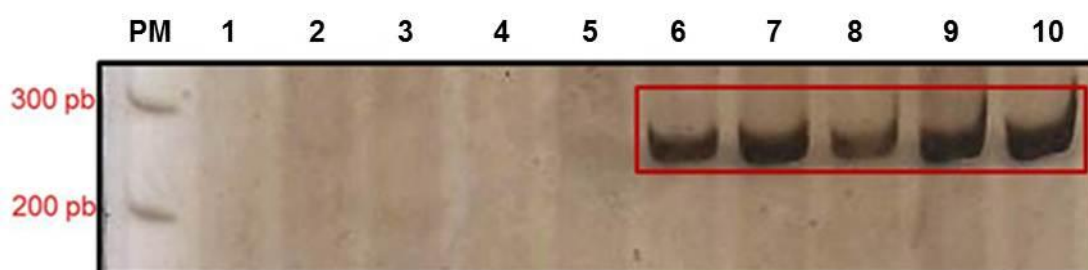


Figura 36 – Detecção de vírus no fígado de camundongos Balb/c infectados com o CARV via SC em avaliação feita por PCR para o segmento L deste vírus. Grupos de camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU e o fígado foi coletado em diferentes tempos pós-infecção. DNA obtido após RT-PCR e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e corado com nitrato de prata Canaletas: PM – padrão de tamanho molecular (ladder de 100 pb); 1 a 5 – controle negativo da reação (animais controle); 6 e 7 – fígado 48 horas; 8 e 9 – fígado 72 horas; 10 – fígado 96 horas.

6.2.2.4 – Dosagem de enzimas hepáticas

Os níveis de alanina transaminase (ALT) e de aspartato transaminase (AST) hepáticas foram medidas como indicadores de dano hepático nos animais infectados com o CARV (FIGURA 38). Um aumento dessas enzimas foi observado, muito comuns após infecção por arbovírus, indicando que o órgão alvo foi o fígado nas infecções pelo CARV.

Os valores de referência destas duas enzimas, ligadas à função hepática, em camundongos são de 17-77 U/mL e valores maiores que 100 U/mL foram encontrados nos animais infectados no tempo de 24 h.p.i. e interessante

valores altos destas enzimas também puderam ser observados no sétimo e décimo oitavo dia pós-infecção (FIGURA 37).

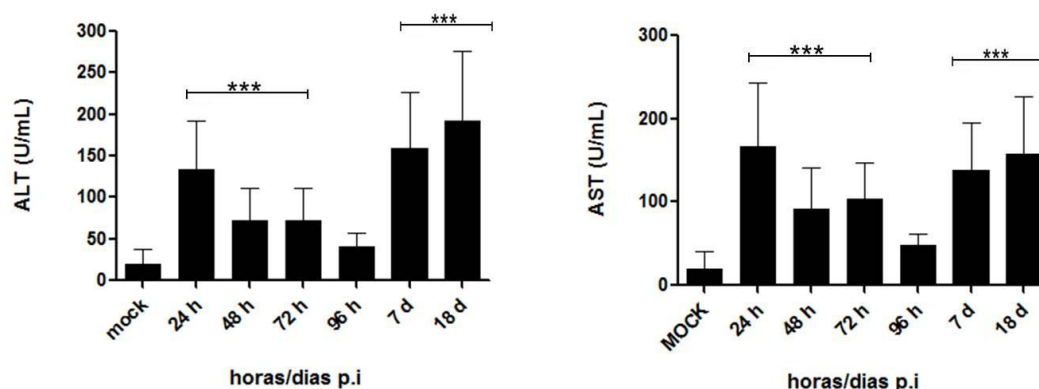


Figura 37 – Níveis de alanina transaminase (ALT) e de aspartato transaminase (AST) em U/L do soro de camundongos Balb/c infectados com o CARV via SC. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU e tiveram o soro coletado em diferentes tempos pós-infecção. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem à $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

6.2.2.5 – Quantificação do CARV no soro e fígado dos animais infectados

A quantificação viral foi feita através de PCR em tempo real através do RNA extraído no fígado e do soro dos animais infectados com o CARV. Para isso foi utilizado um par de primer que amplifica uma porção do segmento L do CARV, desenhado a partir de sequências de membros do gênero *Orthobunyavirus* disponíveis no GenBank.

O produto de PCR amplificado foi indicativo da presença do CARV no soro partir do segundo dia após a infecção (FIGURA 38). Já no fígado dos animais infectados, o produto de PCR, foi observado após três horas e a partir do segundo dia após infecção, revelando um gradativo aumento da multiplicação do vírus relativa até o quarto dia de infecção. Assim, este vírus foi detectado detectado no sétimo dia e no décimo oitavo dia após o início da infecção (FIGURA 39).

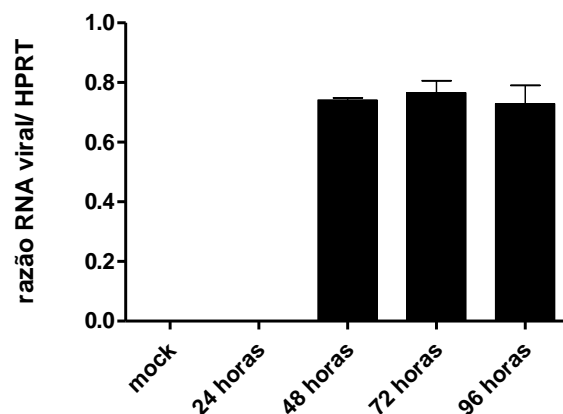


Figura 38 – Detecção de RNA viral no soro de camundongos Balb/c infectados com o CARV via SC em avaliação feita por PCR em tempo real para a quantificação deste vírus. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU via SC e tiveram o soro coletados em diferentes tempos pós-infecção. Animais não infectados foram inoculados com sobrenadante de células VERO. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi feita a PCR em tempo real em duplicata, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação á expressão do gene constitutivo HPRT. A análise foi feita pelo método da curva padrão.

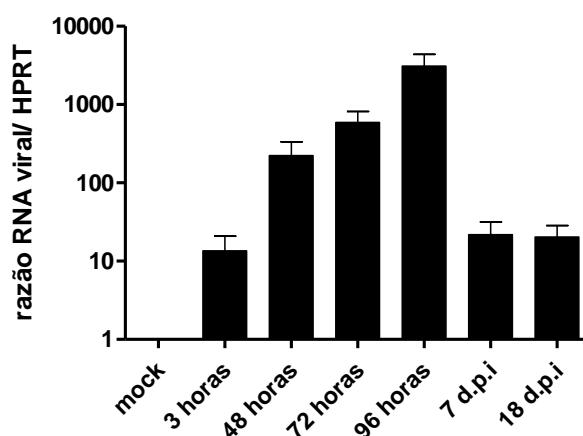


Figura 39 – Detecção de RNA viral no fígado de camundongos Balb/c infectados com o CARV via SC em avaliação feita por PCR em tempo real para a quantificação deste vírus. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU via SC e tiveram o fígado coletados em diferentes tempos pós-infecção. Animais não infectados foram inoculados com sobrenadante de células VERO. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi feita a PCR em tempo real em duplicata, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação á expressão do gene constitutivo HPRT. A análise foi feita pelo método da curva padrão.

6.2.2.6 – Cinética de expressão de citocinas e quimiocinas

Altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias tem sido descritas em modelos murinos após infecção por diversos arbovírus. Assim para avaliar o perfil de citocinas em camundongos Balb/c infectados pelo CARV, o fígado dos animais infectados foram utilizados para quantificar a expressão de diferentes citocinas e quimiocinas através de PCR em tempo real. Como controle foram utilizados fígado de animais inoculados com sobrenadante de células VERO.

As citocinas induzidas no fígado dos animais infectados, com 10^5 PFU do CARV, pela detecção do mRNA, apresentaram um aumento relativo de sua expressão quando comparado aos controles não infectados. O IFNB e IL1B mostraram seu pico máximo de expressão 24 h.p.i. e o IFNG, IL6 e TNFA expressão máxima ocorreu no quarto dia pós-infecção. Um aumento de NOS2 foi observado no quarto dia e no décimo oitavo dia pós-infecção (FIGURA 40).

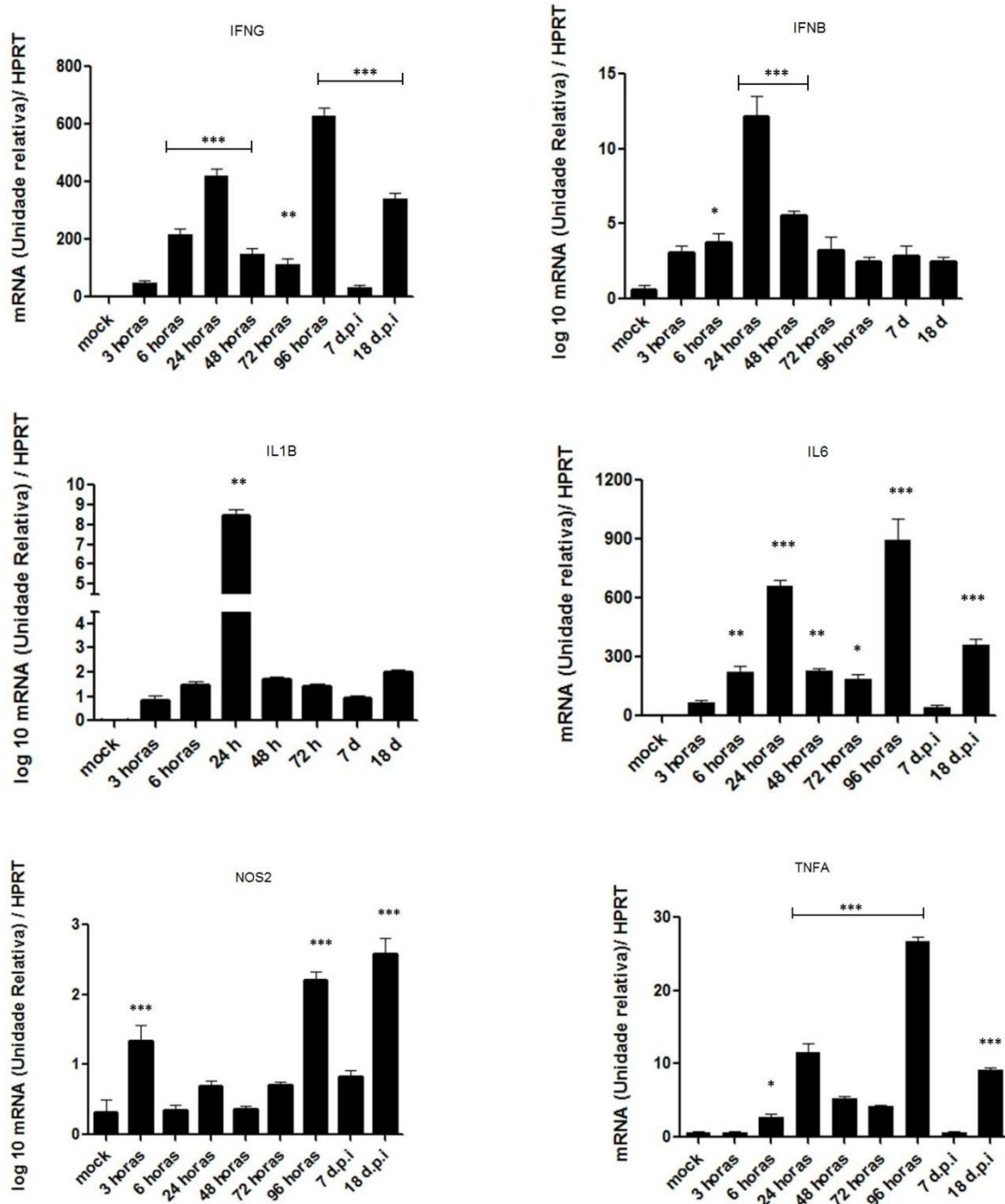


Figura 40 – Cinética de expressão de transcritos de IFNB (IFN beta), IFNG (IFN gama), IL1B (IL-1 beta), IL6 (IL-6), NOS2 e TNFA (TNF alfa) em fígado de camundongos Balb/c infectados com o CARV em avaliação feita por PCR em tempo real. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU via SC e tiveram o fígado coletados em diferentes tempos pós-infecção. Animais não infectados foram inoculados com sobrenadante de células VERO. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi feita a PCR em tempo real em duplicata, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação á expressão do gene constitutivo HPRT. A análise foi feita pelo método da curva padrão. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem á $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem á $p < 0,001$.

Em relação às quimiocinas avaliadas, quanto à indução de mRNA podemos observar que, todas apresentaram perfil semelhante de indução a partir de 72 h.p.i., bem como um aumento significativo também no 18° d.p.i., exceto para CCL2 cujo pico máximo foi observado no 7° d.p.i. (FIGURA 41).

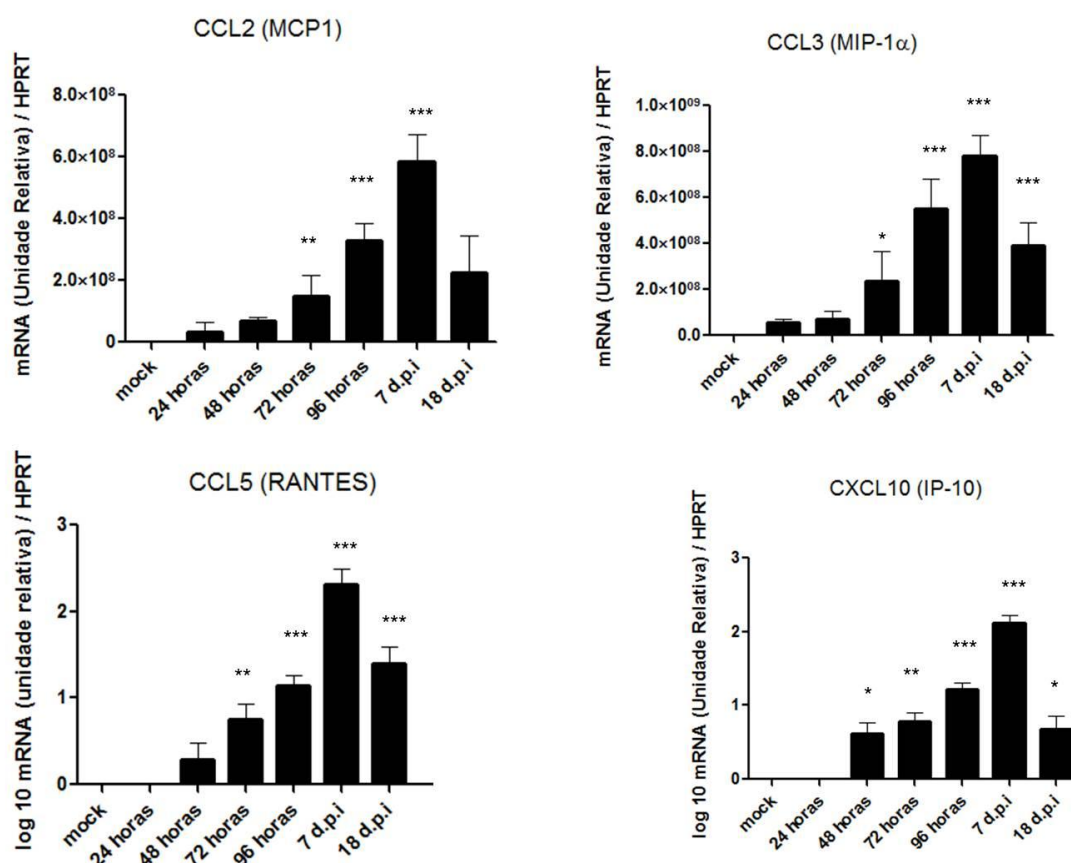


Figura 41 – Cinética de expressão de transcritos de CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES) e CXCL10 (IP-10) em fígado de camundongos Balb/c infectados com o CARAV em avaliação feita por PCR em tempo real. Grupos de 5 camundongos foram infectados com o CARV 10^5 PFU via SC e tiveram o fígado coletados em diferentes tempos pós-infecção. Animais não infectados foram inoculados com sobrenadante de células VERO. Após a extração de RNA e a transcrição reversa, foi feita a PCR em tempo real em duplicata, e a expressão de cada gene foi normalizada em relação á expressão do gene constitutivo HPRT. A análise foi feita pelo método da curva padrão. A análise estatística foi feita através do teste de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett's. Um asterisco (*) corresponde à $p < 0,05$; dois asteriscos (**) correspondem á $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem à $p < 0,001$.

VII – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Para dar início ao presente trabalho, começamos por caracterizar o padrão de crescimento e ECP característico do ITQV. Assim, verificamos que as células VERO mostraram ser um excelente sistema para a multiplicação do ITQV, pois nestas células nós obtivemos altos títulos virais. 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 ITQV foi feita, para garantir uma população de vírus homogênea, visto que, membros desta família viral podem sofrer com frequência rearranjos genéticos entre seus três segmentos de RNA. O fenótipo das placas isoladas (dados não mostrados) foi bastante homogêneo, e a partir deste ponto, isolamos alguns clones aleatoriamente para realizar os ensaios de soroneutralização.

Através do ensaio da NT contra o fluido ascítico murino contendo anticorpos anti-arbo grupo C-I (anti-Apeu, anti-Caraparu, anti-Ossa, anti-Bruconha e anti-Vinces), observamos que, todos os clones virais escolhidos foram reconhecidos pelos anticorpos presentes no fluido ascítico, com título de 3200 UN/mL, o que demonstra uma baixa reatividade entre o ITQV e os arbovírus do grupo C-1. 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 Itaqui e os vírus Apeu e Caraparu, não apresentam semelhanças entre suas glicoproteínas, denominadas Gn e G (codificadas pelo

segmento M) de acordo com o teste de neutralização. 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.

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 8).

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 IFN tipo I e II têm sido extensamente estudados. Hoje as funções dos IFN 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 IFN do tipo I se ligam ao mesmo receptor celular denominado IFNABR, composto por duas subunidades (IFNAR1 e IFNAR2). Como as células Vero respondem bem aos IFN 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 IFN do tipo I contra o ITQV foi dose dependente e o IFN β foi o IFN que mostrou maior eficiência na inibição da multiplicação do ITQV (FIGURAS 13). Isto pode estar relacionado à maior capacidade deste IFN em induzir ISGs (genes estimulados por interferon) relacionados a 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 10 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 ITQV, já que sua multiplicação nestas três doses testadas está totalmente inibida. Possivelmente, os receptores 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 IFN do tipo I e depois desafiada com o ITQV, confirmam essa maior atividade antiviral do IFN β *in vitro* (FIGURA 14). Possivelmente, esta atividade diferencial dos IFN ocorre, portanto, devido as 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 IFN do tipo III foram recentemente identificados e tem demonstrado serem expressos em resposta às infecções virais e por desencadear também uma atividade antiviral *in vitro*. A atividade biológica dos IFN do tipo III mesmo redundantes com as atividades dos IFN do tipo I são em geral menos intensas e mais restritas como citado anteriormente. No entanto, este grupo de IFN é capaz de interferir na multiplicação de vários vírus humanos e murinos. Esta foi a primeira vez que a sensibilidade do ITQV foi testada para esta classe de citocinas. Os IFN 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 IFN do tipo III ainda permanecem por serem esclarecidas completamente.

A estimulação de células VERO com o IFN- λ 2 foi capaz de proteger essas células, da infecção pelo ITQV quando administrado em doses muito superiores àquelas quando comparado aos IFN α/β (1000 UI/mL) (FIGURA 15). Assim, esse IFN do tipo III diminuiu a multiplicação do ITQV em 50% em relação ao controle não tratado, não apresentando uma alta atividade antiviral como os IFN do tipo I. A curva de multiplicação do ITQV em células VERO pré-tratadas com o IFN lambda 2 também foi feita (FIGURA 16), utilizando-se uma alta dose dessa citocina (1000 UI/mL), pois doses mais baixas que esta, não

implicariam em uma inibição significativa do ITQV de acordo com a atividade antiviral observada na FIGURA 15. 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 IFN do tipo I e III parecem ser regulados por um mecanismo comum. Assim essa baixa especificidade do IFN lambda observada em relação aos IFN α e β em muitos ensaios biológicos, necessitam de um melhor entendimento. Almeida *et al.*, 2008 demonstrou também que, os IFN 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 (dados não mostrados). 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*.

Adicionalmente Mordstein *et al.*, 2008 concluiu que, o sistema IFN α/β é dominante sobre o sistema dos IFN do tipo III. Estes dados estão de acordo também com Almeida *et al.*, 2008 que, ao combinar IFN do tipo I e III para tratar células VERO, não observou um sinergismo entre essas citocinas, contra a multiplicação do APEUV.

Os IFN 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 IFN 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 explicada pela alta proteção conferida a uma variedade de patógenos e microrganismos e também para acelerar as respostas imunes (SOMMEREYNS *et al.*, 2008).

Estudos indicam que os IFN do tipo III estariam relacionados à proteção antiviral nas regiões onde existe a interação entre as superfícies epiteliais e o sistema imunológico, enquanto os IFN do tipo I estariam relacionados a

proteção e efeito sistêmicos. Isso reflete o fato dos receptores dos IFN do tipo I serem expressos de maneira ubíqua, enquanto os receptores para os IFN do tipo III são expressos preferencialmente por células epiteliais, células dendríticas e células T (GALLAGHER *et al.*, 2010; JEWELL *et al.*, 2010). Acredita-se, ainda, que os IFN do tipo III seriam os precursores evolutivos dos demais IFN (SOMMEREYNS *et al.*, 2008; GALLAGHER *et al.*, 2010).

A atividade efetora dos IFN do tipo I e III exógeno observada nos experimentos *in vitro* está relacionada à capacidade de inibição da multiplicação do ITQV 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, MxA e PKR. Com este trabalho mostramos que o ITQV é sensível aos IFN 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 ITQV foi redundante em relação aos IFN I e III, e o IFN β o mais potente indutor do estado antiviral. Os dados sugerem que, o sistema imune inato desempenha um importante papel no controle do ITQV. Mais estudos serão necessários para caracterizar a sensibilidade aos IFN do tipo I e III para outros membros da família *Bunyaviridae*, bem como avaliar outros IFN como o tipo II (IFN γ) para membros dessa família.

Após verificar a sensibilidade do ITQV aos IFN dos tipos I e III em células VERO, a próxima etapa foi avaliar a capacidade de indução da expressão dos RNAm dos ISGs 2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA e IRF7 pelo ITQV após a infecção de células humanas A549.

A expressão dos ISGs resulta de uma direta resposta frente a uma infecção viral, em adição a indução pelos IFN. Então não é muito claro se a expressão observada desses genes é de fato induzida por IFN 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 IFN do tipo I e tipo III.

Nós encontramos que, a expressão dos quatro ISGs testados (2'5'OAS, PKR, 6-16 e MxA) e IRF7 foi aumentada nas células A549 após infecção pelo ITQV (FIGURA 17). O aumento da expressão de MxA foi detectado desde 6 h.p.i. e níveis basais deste gene foram observados nas células controle (mock), o mesmo pode ser observado para a expressão do ISG 6-16. Já o gene OAS teve sua expressão máxima detectada apenas no tempo de 24 h.p.i. O gene PKR teve sua expressão aumentada a partir de 12 h.p.i. Por fim, o RNAm do IRF7 teve seu pico de expressão em 12 h.p.i. e este se manteve elevado, no tempo de 48 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 IFN 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; GÁRCIA-SASTRE, 2011).

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). Este mesmo autor 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*.

Almeida e colaboradores em 2008 demonstrou também que, os IFN α 2A, λ 1 e λ 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.

O IRF7 é um fator de transcrição expresso quando a via Jak-STAT é ativada pela ligação dos IFN- β ou IFN- α 4 precocemente expressos em seus receptores celulares. O IRF7 produzido então medeia a expressão dos demais subtipos de IFN α e também de IFN do tipo III. Portanto, IRF7 é também um gene estimulado por IFN, sendo fundamental para a amplificação dos níveis de expressão dos IFN dos tipos I e III (LAZEAR, *et al.*, 2013) (FIGURA 10). Kim e colaboradores em 2007 demonstraram que, o vírus Hantaan (gênero Hantavirus família Bunyaviridae) é capaz de induzir a expressão de IRF7 em 29,4 vezes após 3 dias de infecção de células endoteliais.

Também avaliamos a capacidade de indução da expressão dos RNAm dos IFN β , λ 1 e λ 2/3 após a infecção de células humanas A549 pelo ITQV. Assim demosntramos que o ITQV foi capaz de induzir a expressão do RNAm dos três tipos de IFN analisados. A expressão do RNAm do IFN β e dos IFN λ 1 e IFN λ 2/3 foi detectada a partir de 3 h.p.i. e o pico de expressão ocorreu 24 h.p.i. (FIGURA 18).

Os resultados revelam que o ITQV é capaz de ativar de maneira eficiente o sistema de IFN, levando à expressão de IFN dos tipos I e III e também de genes estimulados por IFN nas células humanas A549. Pode-se concluir que, todos os RNAm dos IFN são precocemente expressos após infecção pelo ITQV e esta expressão se mantém com picos significativos até 48 h.p.i.

Os orthobunyavírus do grupo C têm sido classificados por provas sorológicas como NT e IH desde quando foram inicialmente isolados na década de 50. Tais resultados muitas vezes são ambíguos, o que torna complexa a classificação destes vírus, além da possibilidade de rearranjos genéticos, outra característica importante dos vírus da família *Bunyaviridae*. Dados recentes de caracterização molecular obtidos por pesquisadores do Laboratório de Vírus apontaram a ocorrência de rearranjos entre os orthobunyavírus do grupo C e a

possível presença de uma amostra de outro sorogrupo (De Brito Magalhães *et al.* 2011). Também Pinto (dados não publicados) sequenciou parcialmente o segmento L do ITQ e a topologia da árvore mostrou a formação de 5 diferentes agrupamentos referentes aos cinco diferentes gêneros (*Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*). O ITQV foi agrupado com o gênero *Orthobunyavirus*, confirmando sua classificação sorológica. Essa é a primeira sequência deste segmento descrita até o momento para tal vírus. Assim, fica clara a necessidade da tentativa de sequenciamento dos segmentos genômicos destes vírus. Vale ressaltar que, as únicas sequências disponíveis no GenBank do ITQV e alguns outros membros do grupo C, foram depositadas por pesquisadores do IEC em 2005 e, tais sequências muitas vezes apresentam baixa similaridade de nucleotídeos quando comparadas às amostras estudadas destes vírus do laboratório de Vírus. Os avanços nos estudos moleculares permitirão o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos, evitando a ocorrência das reações cruzadas que são observadas com os métodos sorológicos

O desenvolvimento de modelos experimentais para estudar os mecanismos de replicação dos orthobunyavírus é de suma importância para o entendimento da patogênese e demais aspectos da infecção por estes vírus. Na literatura, poucos trabalhos foram conduzidos até hoje através desta abordagem. No presente trabalho nós caracterizamos a infecção experimental para dois membros dos orthobuniavírus do grupo C Itaqui e Caraparu através da infecção de camundongos Balb/c por via subcutânea.

Em camundongos Balb/c neonatos com o ITQV e CARV, a infecção SC resultou em morte da maioria dos animais pouco tempo após a infecção (em média 3-4 dias). Esses animais desenvolveram sinais clínicos de doença, caracterizados pelo comprometimento do sistema nervoso central. Apesar da via IC não ser aquela naturalmente observada na infecção pelos vírus do grupo C ela foi escolhida, assim como o uso de camundongos neonatos altamente susceptíveis, com o objetivo de se determinar a carga viral mais apropriada para se avaliar os sinais de doença por estes dois vírus em camundongos

adultos, além de avaliar se haveria uma relação da idade dos animais com a suscetibilidade ao vírus.

Nos animais adultos jovens, cujo sistema imunológico já está desenvolvido, a resistência à infecção pelo ITQV foi evidente, pois os animais infectados via SC, os sinais clínicos não foram detectados e o isolamento do vírus foi negativo no fígado, baço e rins destes animais. Estes dados são condizentes aos descritos para o vírus Nepuyo por Deadorff e colaboradores em 2010.

Já os animais infectados pela mesma via com o CARV apresentaram sinais clínicos de doença, e no 7º d.p.i a porcentagem de sobrevivência foi de aproximadamente 66% sendo que, no 18º d.p.i todos os animais tiveram que ser eutanaziados devido à acentuada perda de peso que foi superior a 20% do peso corporal inicial dos animais. Estes apresentaram sinais clínicos de doença como perda de peso significativa, pilo-ereção, arqueamento de dorso, intenso edema facial e respiração superficial e cianose das patas traseiras (FIGURA 26). Além disso alterações macroscópicas foram evidentes no fígado e baço de todos os animais infectados, quando comparados com animais controle (FIGURA 27). Foi possível isolar o vírus apenas do fígado dos animais infectados com o CARV via SC (FIGURA 28). Uma elevada viremia foi observada a partir do 2º d.p.i no fígado dos animais infectados, o que sugere que este órgão é o alvo para a multiplicação do CARAV e possivelmente do ITQV, apesar de não termos isolado o vírus no fígado daqueles animais, o que acredito ser por um erro da técnica.

Os exames histopatológicos dos animais infectados com o ITQV e com o CARV mostraram raros linfócitos portais, parênquima com infiltrado inflamatório de atividade discreta e focal além de alterações discretas de hepatócitos, infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose. A arquitetura hepática lobular ficou completamente preservada. (FIGURAS 20 e 29). Podemos concluir que, as alterações histopatológicas detectadas no fígado foram consistentes com quadro de hepatite aguda, o que foi confirmado pelo aumento das transaminases hepáticas após infecção pelos dois vírus.

A resposta humoral mediada por anticorpos circulantes foi bastante significativa nos animais adultos infectados com o ITQV (nas diferentes cargas virais utilizadas) e o CARV (10^5 PFU) (FIGURAS 21 e 30). A resposta imune inata representada pela produção de IFN também foi muito importante nos estágios iniciais da infecção, havendo uma estreita relação com a presença do vírus no sangue (determinada pela titulação por contagem de placas).

Foi possível ainda para o CARV demonstrar a presença de RNA viral no soro e fígado dos animais infectados via SC através da reação de PCR convencional nos tempos de 48, 72 e 96 horas pós-infecção. Adicionalmente a quantificação viral foi feita através de PCR em tempo real, no fígado e no soro dos animais infectados com o CARV. Foi possível detectar assim o genoma do CARV no soro partir do segundo dia após a infecção pelo CARV (FIGURA 35) e no fígado dos animais (FIGURA 36) foi possível detectar o genoma viral após três horas após o início da infecção revelando um gradativo aumento da carga viral relativa até o quarto dia de infecção. Interessantemente tal vírus também pode ser detectado no 7° e 18° d.p.i, o que coincidiu pouco depois, com o início dos sinais clínicos nos animais no 9° d.p.i. o que culminou em 100% de morte dos animais no 18° d.p.i.

Esses dados sugerem que, a susceptibilidade à infecção por estes dois vírus é dependente da maturação do sistema imune, pois os dados mostraram que, a susceptibilidade à infecção foi dependente da maturação do sistema imune, pois os animais neonatos sucumbiram à infecção em torno de 3- 4 d.p.i. e, que o sistema IFN desempenha papel importante na resistência inicial do hospedeiro. A imunidade humoral também é importante, uma vez que, uma única infecção foi capaz de induzir a formação de altos títulos de anticorpos neutralizantes. O efeito protetor desses anticorpos provavelmente se deve ao reconhecimento das glicoproteínas Gn e Gc do envelope do vírus.

Estes dados corroboram os de Mucha-Macías e colaboradores em 1969, onde estudos conduzidos em ratos (*Mus musculus albinus*) com o APEUV mostraram que animais lactentes foram mais susceptíveis à infecção IC em relação aos animais adultos. Nos lactentes, foi observado o aparecimento de

enfermidade e morte (100%), enquanto que nem todos os ratos adultos apresentaram sinais de doença (resistência à doença). As alterações histopatológicas mais características no fígado foram áreas de necrose e infiltrado inflamatório.

Interessantemente Brinton e colaboradores em 1993 demonstram que, camundongos neonatos sucumbem à infecção pelo CARV após desenvolverem hepatite e encefalite quando inoculados via IC, enquanto camundongos adultos inoculados pela via IP desenvolviam apenas hepatite sem qualquer sinal clínico de doença até sua morte por volta de 4-5 d.p.i.

Altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias têm sido descritas em modelos murinos após infecção por diversos arbovírus, e desempenham muitas vezes papel chave na patogênese destes vírus. Para caracterizar a resposta imune frente à infecção pelos vírus Itaquí e Caraparu, nós determinamos uma cinética do nível de expressão dos RNAm de algumas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias através de PCR em tempo real do fígado destes animais infectados.

As citocinas são proteínas secretadas durante a resposta imunológica inata e adaptativa, com função de mediadores inflamatórios ou de moléculas moduladoras durante o curso de várias arboviroses (BOZZA *et al.*, 2008). A relação entre a produção de citocinas e a doença grave após infecções por alguns patógenos não é totalmente compreendida, mas é cada vez mais reconhecido que o equilíbrio entre a produção das citocinas esteja envolvido entre a resposta imune protetora e patológica (KRUIF *et al.*, 2008).

Assim neste estudo, nós demonstramos que após infecção de camundongos imunocompetentes com o ITQV e CARV, estes foram capazes de induzir altos níveis de transcritos de citocinas após a infecção com 10^5 PFU dos vírus citados. No caso do ITQV, as citocinas IFNB, IFNG, IL1B mostraram um perfil semelhante, com pico de expressão máxima 24 h.p.i; já IL6, NOS2 e TNFA tiveram seu pico máximo de expressão às 96 h.p.i. Com relação às quimiocinas

CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10, estas também apresentaram perfil de indução semelhante com aumento progressivo até o 7° d.p.i.

Já para o CARV, as citocinas IFNG, IL6 E TNFA apresentaram perfil semelhante de indução, com pico máximo de expressão em 96 h.p.i, mas com picos significativos de expressão também em 24 h.p.i e aos 18° d.p.i. As citocinas IFNB, IL1B apresentaram por sua vez um pico máximo de expressão 24 h.p.i com um decaimento após este tempo até os 18° d.p.i. Por fim NOS2 mostrou apresentar uma indução significativa precoce em 3 h.p.i, e depois também com 96 h.p.i e curiosamente no 18° d.p.i O perfil de indução de quimiocinas para o CARV mostrou-se semelhante também, onde um aumento progressivo de indução significativa foi observado para CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10 a partir de 48 h.p.i até o 7° d.p.i, com ligeiro decaimento no 18° d.p.i. CXCL10 apresentou porém uma indução significativa também às 48 h.p.i.

Observamos neste modelo que animais com altos níveis de ALT (acima de 300 U/mL), também foram os que apresentaram um maior aumento nos níveis de expressão de algumas citocinas e quimiocinas indicando uma forte correlação com os danos hepáticos observados na histopatologia, bem como a aparência do órgão durante a necropsia dos animais infectados.

O aumento da expressão de NOS2 no 18° d.p.i pelo CARV, acompanhados por agravamento dos sinais clínicos e presença de RNAm no fígado dos animais infectados foram observados ao mesmo tempo. Estudos apontam que o óxido nítrico (NO), pode influenciar na gravidade das febres hemorrágicas virais, provavelmente, quando produzido em concentrações elevadas, ao afetar o tônus vascular e contribuindo para o choque induzido pelos vírus (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). O que poderia explicar dentre outros fatores tal agravamento citado. Além disso, NOS2 é responsável pela ação citotóxica dos macrófagos e dos neutrófilos e o NO tem sido relacionado à inflamação crônica. Ademais, quando associado ao TNFA, NOS2 e aos danos hepáticos, estes podem induzir um aumento expressivo de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias (BLAIS & RIVEST, 2004). Em doses ótimas tem ação protetora e regulatória, mas em concentrações elevadas, o NO tem

efeitos tóxicos (CHATURVEDI & NAGAR, 2009). Interessantemente, estudos recentes demonstraram que, TNFA estimula a produção de substâncias vasodilatadoras e também é indutor de NOS que tem efeitos importantes na permeabilidade capilar do endotélio (DENG, *et al.*, 2012).

IL1B é o maior mediador das respostas imunes inatas e responsável também pelas respostas da fase aguda da infecção incluindo febre e anorexia. Interessantemente CCL2 é um marcador de doença grave em modelos murinos e primatas para o vírus Ebola (BENTE, *et al.*, 2010). E aqui encontramos a expressão de IL1B (24 h.p.i) e CCL2 (72 -96 h.p.i) bastante elevada após a infecção pelo ITQV e CARV, o que muitas vezes foi condizente com a viremia observada nestes tempos. Um aumento de TNFA e IL6 também é relacionado a gravidade de algumas doenças pelos bunyavírus como a Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo. TNFA por sua vez contribui para ativação de macrófagos e é relacionado também à gravidades de outras febres hemorrágicas virais (BENTE, *et al.*, 2010). E CCL5 é uma quimiocina predominantemente quimiotática para leucócitos monucleares e é essencial para o desenvolvimento de uma resposta protetora do tipo TH1 contra infecções virais (ANSARI, *et al.*, 2001).

A avaliação do perfil da indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias após infecção pelo ITQ e CARV nós proporcionou uma melhor compreensão sobre a montagem da resposta imune mediada por estes dois orthobuniavírus e assim fazer algumas importantes inferências. Um aumento nos estágios iniciais de infecção da transcrição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, pode levar a um possível controle do vírus, na tentativa de prevenir sua disseminação. Por exemplo, IL6 e CXCL10 codificam para proteínas inflamatórias que podem contribuir para a modulação da temperatura e migração de leucócitos para o sítio de infecção (MENDENHALL *et al.*, 2009).

Todos estes dados em conjunto mostraram uma importante relação entre a infecção por estes dois orthobunyavírus, objeto deste estudo, e sua estreita relação com a imunidade inata e suas subseqüentes respostas. Assim podemos concluir que, a infecção pela via SC utilizando os orthobunyavírus

Itaqui e Caraparu se mostrou uma ótima via de inoculação, pois mimetiza a infecção natural por estes vírus, causando sinais clínicos evidentes no caso do CARV, o que torna esta amostra do CARV do Laboratório de Vírus um excelente modelo experimental. Há uma montagem de uma forte resposta inflamatória desencadeada após infecção por estes dois vírus, com possível recrutamento de células inflamatórias, visto a elevação de algumas importantes citocinas relacionadas a esta função, para os tecidos afetados, neste caso o fígado, o que poderá ter contribuído também para a patogênese do ITQV e CARV. Porém, mais estudos serão necessários para melhor caracterizar as respostas imunológicas desencadeadas por estes dois bunyavírus.

No Brasil, pouco se sabe sobre a diversidade, dispersão, epidemiologia e características moleculares sobre os orthobunyavírus circulantes, apesar da importância notória desta família viral e de terem sido primeiramente isolados no século passado. Assim, o presente trabalho traz contribuições significativas para uma melhor compreensão do potencial patogênico e possíveis agentes terapêuticos, de dois vírus da família *Bunyaviridae*, além de trazer também, uma melhor compreensão sobre o relacionamento filogenético do ITQV, pois informações sobre a sequência destes vírus, facilitam a compreensão sobre a taxonomia e mecanismos de evolução destes vírus. Ao final deste trabalho fica a evidente necessidade de mais estudos de sequenciamento do genoma do vírus ITQV e de outros membros dos orthobunyavírus do grupo C, ressaltando-se a importância evolutiva dos eventos de rearranjo capazes de alterar o perfil patogênico e potencial emergente dos vírus da família *Bunyaviridae*.

VIII – CRONOGRAMA DE TRABALHO

8.1 – CRONOGRAMA

Atividades	Ano		2009		2010		2011		2012		2013
	Semestre		1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º	
Obtenção de créditos		X	X								
Multiplicação das amostras virais	X	X									
Purificação das amostras virais	X	X									
Infecção de camundongos BALB/c neonatos e adultos				X	X	X					
Processamento de órgãos e soros				X	X	X	X				
Estudos de histopatologia					X	X					
PCR convencional para detecção do genoma viral nos animais infectados						X					
Amplificação dos segmentos genômicos e sequenciamento											X
Análises e inferências filogenéticas											X
Padronização PCR em tempo real						X	X				
Resposta antiviral de IFN e ISGs		X	X								
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Redação de artigo científico									X	X	
Redação e defesa da Tese									X	X	

IX – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.1 – Bibliografias

AEBI M., FAH J., HURT N., SAMUEL C.E., THOMIS D., BAZZIGHER L., PAVLOVIC J., HALLER O., STAEHELI P. 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 type I interferons and interleukins 29 and 28^a (type III interferons) against Apeu vírus. *Antiviral Research*. vol.80 no.3 p.302-308.Dec. 2008.

ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuclei Acids Research*, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDERSSON I., BLADH L., MOUSAVI-JAZI M., MAGNUSSON K-E., LUNDKVIST A., HALLER O., MIRAZIMI A. Human MxA Protein Inhibits the Replication of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Journal Of Virology*. vol. 78, no. 8. p. 4323-4329 .Apr. 2004.

ANK N., WEST H., BARTHOLDY C., ERIKSSON K., THOMSEN A.R., PALUDAN S.R. 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 *Orthobunyavius*. *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 purifying the three genome segments of *Orthobunyavirus*. *Virus Reviews & Research*, v. 10, nº1, p. 55-58, 2005.

AURICCHIO, P., SALOMÃO, M. G. Técnicas de Coleta e Preparação de Vertebrados. 1. ed. Arujá SP: Terra Brasilis, 2002. v. 1. 350 p.

ASSIS M.T.A. Sensibilidade do Orthobunyavirus do Grupo C, Oriboca (BeAn 17) aos interferons humanos tipo I e tipo III. 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. 2009.

AZEVEDO R.S.S., MARTINS L.C., RODRIGUES S.G., ROSA J.F.S.T., VASCONCELOS P.F.C. 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., LEONARD G.T.Jr., BANDYOPADHYAY T., STARK G.R., SEM G.C. 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.

BENTE, D.A., ALIMONTI, J.B., SHIEH, W.J., CAMUS, G., STROHNER, U., ZAKI, S., JONES, S.M. Pathogenesis and Immune Response of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in a STAT-1 Knockout Mouse Model. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 11089–11100 Vol. 84, No.2 Nov.2010.

BILLECOCQ A., SPIEGEL M., VIALAT P., KOHL A., WEBER F., BOULOY M., HALLER O. NSs protein of Rift Valley Fever Virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *Journal of Virology*. v. 78.n.18. p.9798-9806. Sept. 2004.

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

BLAIS, V., RIVEST, S. Effects of TNF- α and IFN- γ on Nitric Oxide-Induced Neurotoxicity in the Mouse Brain. *J Immunol* 172: 7043-7052. 2004.

BLAQORI 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., MICHELS 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.

BLITVICH, B.J., SAIYASOMBAT, R., DORMAN, K.S., GARCIA-REJON, J.E., FARFAN-ALE, J.A., LOROÑO-PINO, M.A. Sequence and phylogenetic data indicate that an orthobunyavirus recently detected in the Yucatan Peninsula of Mexico is a novel reassortant of Potosi and Cache Valley viruses. *Arch Virol* 157:1199–1204, 2012.

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.

BOWIE A., UNTERHOLZNER L., Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews.* v.8. Dec. 2008.

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.

BRIDGEN A., WEBER F., FAZAKERLEY J.K., ELLIOT R.M. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *PNAS.* vol.18. n.2.p.664-669. Jan.2001.

BRINTON, M.A., GAVIN, E.I, LO, W.K, PINTO, A.J., MORAHAN, P.S. Characterization of murine Caraparu Bunyavirus liver infection and immunomodulator-mediated antiviral protection. *Antiviral Research.* V. 20; issue 2; p. 155–171. 1993.

BOZZA FA, CRUZ OG, ZAGNE SMO, AZEREDO EL, NOGUEIRA RMR, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 8: 86. 2008.

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

CARLTON-SMITH, C. & ELLIOTT, R.M. Viperin, MTAP44, and Protein Kinase R Contribute to the Interferon-Induced Inhibition of Bunyamwera *Orthobunyavirus* Replication. *J. Virol.* Nov, vol. 86, n. 21. p.11548-11557, 2012.

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

CASALS, J. Viruses: The versatile parasites of the arthropod-borne group of animal viruses. *Annals of the New York Academic of Science*, 19: 219-235, 1957.

CASALS J. & BROWN L. V. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J Exp Med.* May 1;99(5):429-49, 1954.

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.

CHATURVEDI, U.C, NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *Immunol Med Microbiol* 56: 9– 24. 2009.

CHOWDHARY, R., STREET, C., TRAVASSOS DA ROSA, A., NUNES, M.R.T., TEE, K.K., HUTCHISON, S.K., VASCONCELOS, P.F.C., TESH, R.B., LIPKIN, W.L., BRIESE, T. Genetic characterization of the Wyeomyia group of orthobunyaviruses and their phylogenetic relationships. *Journal of General Virology* ,v. 93, p.1023–1034, 2012.

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.

COFFEY, L. L., FORRESTER N., TSETSARKIN, K., VASILAKIS, N., WEAVER, S. C. Further research is needed to understand the potential of these and other arboviruses to emerge in the future, invade new geographic areas, and become important public and veterinary health problems. *Future Microbiol.* v.8(2), 155 -176, 2013.

DEARDORFF, E.R., FORRESTER, N.L., TRAVASSOS DA ROSA, A.R., ESTRADA-FRANCO, J.G., NAVARRO-LOPES, R., TESH, R.B., WEAVER, S.C. Short Report: Experimental Infections of *Oryzomys couesi* with Sympatric Arboviruses from Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 2. 2010.

DE BRITO MAGALHÃES, C. L., DRUMOND B.P, NOVAES R.F, QUINAN B.R, DE MAGALHÃES J.C, DOS SANTOS J.R, PINTO C.DO. A, ASSIS M.T, BONJARDIM C.A, KROON E.G, FERREIRA P.C. Identification of a phylogenetically distinct orthobunyavirus from group C. *Arch Virol.* Jul; 156(7): 1173-84. 2011.

DENG, B., ZHANG, S., GENG, Y., ZHANG, Y., WANG, Y., YAO, W., WEN, Y., CUI, W., ZHOU, Y., GU, Q., WANG, W., SHAO, Z., WANG, Y., LI, C., WANG, D., ZHAO., LIU, P. Cytokine and Chemokine Levels in Patients with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *PLoS ONE.* vol. 7, Issue 7, Jul, 2012.

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.

DOMINGO E., GOMEZ J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Research.* v.127.n. 2. p. 131-150. Aug. 2007.

DULBECCO, R., M. VOGT. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus. *J exp Med*, v. 99, p.167-82. 1954.

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

EWING B., GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING B., HILLIER L., WENDL M.C., GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, p.175-185, 1998.

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.

FRIBORG, J., LEVINE, S., CHEN, C., SHEAFFER, A.K., CHANIEWSKI, S., VOSS.S., LEMM, J.A., MCPHEE, F. Combinations of Lambda Interferon with Direct-Acting Antiviral Agents Are Highly Efficient in Suppressing Hepatitis C Virus Replication. *Antimicrob. Agents. Chemother.* March. vol. 57, n. 3, P. 1312-1322, 2013.

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.

GALLAGHER, G., N. J. MEGJUGORAC. The Lambda Interferons: Guardians of the Immune–Epithelial Interface and the T-helper 2 Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v.30, n.8, p.603-615. 2010.

GARCÍA-SASTRE, A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Research*. V.162, Issues 1–2, p.12–18, Dec. 2011.

GARCIA S., CRANCE J.M., BILLECOCQ A., PEINNEQUIN A., JOUAN A., BOULOY M., GARIN D. Quantitative Real-Time PCR Detection of Rift Valley Fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds *Journal of Clinical Microbiology*. vol 39. no.12 p. 4456–4461. Dec. 2001.

GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, DECALLONNE B, BOUILLON R, MATHIEU C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, v.25, p.386-401, 2001.

GOETSCHY J.F. ZELLER H., CONTENT J., HORISBERGER M.A. 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.

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.

GOODBOURN 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.

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.

GORDON D., ABAIJIAN C., GREEN P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORDON D., GREEN P. Automated finishing with Autofinish. *Genome Research*, v. 11, p. 614-625, 2001.

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.

GUU, T.S.Y., ZHENG, W., TAO, Y.J. Bunyavirus: Structure and Replication. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1, Volume 726, Viral Molecular Machines, Part 2, Chapter 11, p. 245-266. 2012.

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

HAMMOM, W.M. Symposium on world medicine. Arthropod-borne viral encephalitis. *Public Health Reports*. Vol. 76, No. 9, September 1961.

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.

HJELLE, B & TORRES- PÉREZ, F. Hantaviruses in the Americas and their role as emerging pathogens. *Viruses*, 2, 2559-2586; 2010.

HOLZINGER D., JORNS C., STERTZ S., BOISSON-DUPUIS S., THIMME R., WEIDMANN M., CASANOVA J-L., HALLER O., KOCHS G. 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.

IKEGAMI T., NARAYANAN K., WON S., KAMITANI W., PETERS C.J., MAKINO S., Rift Valley Fever Virus NSs Protein Promotes Post-Transcriptional Downregulation of Protein Kinase PKR. *PLoS Pathog*. v. 5. n.2. 2009.

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.

IVERSSON, L. B., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., COIMBRA T.L.M., FERREIRA I.B., NASSAR E.S. Human disease in ribeira valley, brazil caused by caraparu, a group c arbovirus - Report of a case. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* vol.29, n.2, pp. 112-116. 1987.

JEWELL, N.A., T. CLINE, et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol*, v. 84(21), p.11515-22. 2010.

JOKLIK, W.K. - Interferons. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. (Ed.). *Virology.*, 2^a 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 Trindade and Surinam. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 16, p. 74-78, 1967.

KATZE M.G., HE Y., JUNIOR M.G. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology.* vol. 2, p. 675-687. Sept. 2002.

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.*vol 22. p. 987-992. 2007.

KIM, S.H. *et al.* Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFNaR1 and IFNaR2. *Gene*, v.196, n.1-2, Sep 1, p.279-286. 1997.

KOCHS G., JANZEN C., HOHENBERG H., HALLER O. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *PNAS.* vol. 99. n. 5. p. 3153–3158. 2002.

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.

KRUIF MD, SETIATI TE, MAIRUHU ATA, KORAKA P, ABERSON HA. Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e215. 2008.

KUHN R.J., ZHANG W., ROSSMANN M.G., PLETNEV S.V., CORVER J., LENCHES E., JONES C.T., MUKHOPADHYAY S., CHIPMAN P.R., STRAUSS E.G, BAKER T.S., STRAUSS J.H. Structure of Dengue Virus: implications for *Flavivirus* organization, maturation, and fusion. *Cell*. vol. 108, p.717–725. March, 2002.

KUMAR S., TAMURA K., NEI M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v. 5, p. 150-163, 2004.

KUNO G., MITCHELL C.J., CHANG G.J., SMITH G.C. Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *Journal Clinical Microbiology*, v. 34 (5), p. 1184-1188, 1996.

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.

LAZEAR, H.M., LANCASTER, A., WILKINS, C., SUTHAR, M.S., HUANG, A., VICK, S.C., CLEPPER, L., THACKRAY, L., BRASSIL, M.M., VIRGIN, H.W., NIKOLICH-ZUGICH, J., MOSES, A.V., JUNIOR, M.G., FRU" H, K., DIAMOND, M.S. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling. *PLOS Pathogens* org. 1, v.9, Jan. Issue 1, 2013.

LE MAY, N., BOULOY, M. Antiviral escape strategies developed by bunyaviruses pathogenic for humans. *Biosci (Schol Ed)*. Jan 1;4:1065-77, 2012.

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-GARCÌA 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.

LIVONESI M.C., SOUSA R.L.M., BADRA S.J., FIGUEIREIDO L.T. M. *In vitro* and *in vivo* studies of the Interferon-alpha action on distinct *Orthobunyavirus*. *Antivir. Res.* 2007.

LOLE K.S., BOLLINGER R.C., PARANJAPE R.S., GADKARI D., KULKARNI S.S., NOVAK N.G., INGERSOLL R., SHEPPARD H.W., RAY S.C. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.*, v. 73, p. 152-160, 1999.

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.

MACHADO A.M.V. Expressão do gene MxA induzido pelos Bunyavirus do Grupo C (Apeu, Itaqui, Marituba e Oriboca) e pelo Interferon Beta Recombinante Humano, em células WISH. 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. Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 1998.

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. Caracterização de amostras de Bunyavirus do Sorogrupo C (*Bunyaviridae*) por estudos biológicos e moleculares. Dissertação de Doutorado apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia. 2008.

MAGALHÃES C.L.B., QUINAN B.R., NOVAES R.F.V., SANTOS J.R., KROON E.G., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C.P. 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.

MATIOLI S. R. *Biologia molecular e evolução*. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Holos, Editora, v. 1. 202 p., 2001.

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.

MELTZER, E. Arboviruses and Viral Hemorrhagic Fevers (VHF). *Infectious Disease Clinics of North America*. Jun., v. 26, issue 2, p. 479–496, 2012.

MELTZ, S. W. & PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. *Journal of Invertebrate Pathology* 107. 2011.

MENDENHALL, M., WONG, M., SKIRSPTUNAS, R., MORREY, J.D., GOWEN,B.B. Punta Toro Virus (*Bunyaviridae, Phlebovirus*) Infection in Mice: Strain Differences in Pathogenesis and Host Interferon Response. *Virology*. 5; 395(1): p.143–151,Dec. 2009

MILLS JN, CHILDS JE, KSIAZEK TG, PETERS CJ, VELLECA WM. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. Atlanta: US Department of Health and Human Services 1995.

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.

MUCHA MACÍAS, J., MATA, D.A., LARIOS, M.E.O., AQUINO, M.L.Z. Infección experimental con el virus Apeu en ratones (*Mus musculus albinus*). Lesiones histopatológicas. *Salud Publica de Mexico*, v. XI (3), p. 323-338, 1969.

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

NEVES-SOUZA P.C.F, AZEREDO E.L, ZAGNE S.M.O, VALLS-DE-SOUZA R., REIS, S.R.N.I. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC InfectDis* 5: 64. 2005.

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., VASCONCELOS H.B., MEDEIROS D.B.A., RODRIGUES S.G., AZEVEDO R.S.S., CHIANG J.A., MARTINS L.C., VASCONCELOS P.F.C. 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.

OLIVEIRA, D.B., ALMEIDA, G.M.F., GUEDES, A.C.M., SANTOS, P.S.T., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Basal Activation of Type I Interferons (Alpha2 and Beta) and 2'5'OAS Genes: Insights into Differential Expression Profiles of Interferon System Components in Systemic Sclerosis. *Int. J. Rheumatol.*; v.2011,Nov. 2011.

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.

PEIXOTO, M. L. P. Sensibilidade de arbovírus do grupo C (*Bunyaviridae*) a ação de interferon humano. 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. 1977.

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.

PEPIN, M., BOULOY, M., BIRD, B.H., PAWESKA, J. Rift Valley fever virus(*Bunyaviridae: Phlebovirus*): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res*. Nov-Dec, 2010.

PEREIRA, L. E. ; SUZUKI, A. ; FERREIRA, I. B. ; SOUZA, R. P. ; MAYER, S. R. ; MAGRINI, J. ; SOUZA, L. T. M. . Vigilância Epidemiológica da hantavirose no Brasil. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA), São Paulo, SP, v. Ano 1, n. 2, p. 1-13, 2004.

PETRILLO-PEIXOTO M. L., FERREIRA P.C.P., MEZENCIO J.M.S., GOLGHER R.R. 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.

PIFAT, D. Y., SMITH, J.F. Punta Toro virus infection of C 57 BL/ 6 J MICE: a model for phlebovirus- induced disease. *Microbial Pathogenesis*, 3: 409 – 422, 1987.

PINHEIRO F.P., ROSA A.P.A.T., ROSA J.F.T. Arboviroses. *In: Saúde na Amazônia*. 2 ed. São Paulo 1983.

PINTO, C.A. caracterização dos *Orthobunyavirus* do grupo C: indução de genes estimulados por interferons pelo vírus Caraparu in vitro e sequenciamento parcial do vírus Apeu. 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. 2011.

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., YE C., SEN G., HJELLE B. 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, MAGALHÃES C.L.B., NOVAES R.F.V., SANTOS J.R., KROON E.G., BONJARDIM C.A., FERREIRA P.C.P. Sequence and phylogenetic analysis of the large (L) segment of the Tahyna virus genome. *Virus Genes.* p.435–437. 2008.

ROSA A.P.A.T., ROSA J.F.S.T., PINHEIRO F.P., VASCONCELOS P.F.C. *Arboviroses In: Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico.* Ed.Cejup. Univ. Est.Pará. Inst.Evandro Chagas.886p.1997.

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.

SCHMIDT N. J. Cell culture techniques for diagnostic virology. In E. H. Lennette and N. J. Schmidt (ed.), *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. p. 65-139, 1979.

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

SHOPE R.E., CAUSEY C.E., CAUSEY O. Itaquí 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 agent 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.

SMITH C. E.G. Arthropod born viruses. *Br Med Bull* 15(3): 235-239, 1959.

SMITH DR, STEELE KE, SHAMBLIN J, HONKO A, JOHNSON J, REED C, KENNEDY M, CHAPMAN JL, HENSLEY LE. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology*. Nov.25;407(2):256-67, 2010.

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 β 3 as a receptor for Hantaan virus cellular entry. *Experimental and Molecular Medicine*,. v. 37, no 2, p. 121-127, 2005.

STOLTZ M., AHLM C., LUNDKVIST A., KLINGSTRÖM J. 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.no.16. p. 8685-8691. 2007.

STREITENFELD H.A., BOYD A., FAZAKERLEY J.K., BRIDGEN A., ELLIOTT R.M., WEBER F. Activation of PKR by Bunyamwera virus is dependent of the viral interferon antagonist NSs. *Journal of Virology*, v. 77, p. 5507-5511, 2003.

TANIGUCHI T., TAKAOKA A. A weak signal strong responses: interferon- α/β revisited. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. v.2. p. 378-386. 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*. vol.89. p. 729-734. 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.

WALTER CT, BARR JN. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol*. Nov; 9. 2467-84. 2011.

WEAVER, S.C. & BARRETT, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology* 2, 789-801, 2004.

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.

WEBER H., VALENZUELA D., LUJBER G., GUBLER M., WEISSMANN C. Single amino acid changes that render human IFN-alpha 2 biologically active on mouse cells. *Embo Journal*. v. 6, p. 591-598, 1987.

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.

ZDHANOV V. M., PYRIKOVA A. P., FADEEVA L. L. Use of the haemagglutination-inhibition test in the study of museum strains of neuroviruses. *Bull World Health Organ.*; 24(6): 743–748, 1961.

YU, X., LIANG, M., ZHANG, S., LIU, Y., LI, J., SUN, Y., ZHANG, L., ZHANG, Q., POPOV, V.L., LI, C., QU, J., LI, Q., ZHANG, Y., HAI, R., WU, W., WANG, Q., ZHAN, F., WANG, X., KAN, B., WANG, S., WAN, K., JING, H., LU, J., YIN, W., ZHOU, H., GUAN, X., LIU, J., BI, Z., LIU, G., REN, J., WANG, H., ZHAO, Z., SONG, J., HE, J., WAN, T., ZHANG, J., FU, X., SUN, L., DONG, X., FENG, Z., YANG, W., HONG, T., ZHANG, Y., WALKER, D.H., WANG, Y., LI, D. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. *New Engl. J. Med.* 364;16, april 21, 2011.

ZELENÁ 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.* vol.53. p.106-110. Aug. 2008.

X – ANEXOS

10.1 – Produção bibliográfica

Arch Virol
DOI 10.1007/s00705-011-0976-1

ORIGINAL ARTICLE

Identification of a phylogenetically distinct orthobunyavirus from group C

Cintia Lopes de Brito Magalhães · Betânia Paiva Drumond · Renata Franco Vianna Novaes · Bárbara Rezende Quinan · José Carlos de Magalhães · João Rodrigues dos Santos · Carla do Amaral Pinto · Marieta Torres de Abreu Assis · Cláudio Antônio Bonjardim · Erna Geessien Kroon · Paulo César Peregrino Ferreira

Received: 4 October 2010 / Accepted: 8 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Apeu virus (APEUV) (family *Bunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*) was plaque purified and characterised by serological and molecular analysis. Neutralising assays confirmed cross-reactivity between purified APEUV clones and the Caraparu virus complex of group C orthobunyaviruses. Partial sequencing of the L, M and S segments of one APEUV clone (APEUV-CL5) was carried out. A phylogenetic tree constructed with the L amino acid sequences clustered APEUV-CL5 within the genus *Orthobunyavirus*, confirming its serological classification. Analysis of M segment sequences clustered APEUV-CL5 in the Caraparu virus complex (Group C), in agreement with serological tests and previous molecular characterisation. However, the sequence of the nucleocapsid gene

(N) gave low identity values when compared to those of the group C viruses. The phylogenetic tree based on N nucleotide sequences clustered APEUV-CL5 next to the California and Bwamba groups. This remarkable S nucleotide variability suggests that APEUV-CL5 could be a genetic reassortant and that this evolutionary mechanism is present in the history of the group C viruses.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 241/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização de amostras dos Orthobunyavirus do grupo C: patogênese viral**", que tem como responsável(is) **Paulo Cesar Peregrino Ferreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **23/ 11/2011**.

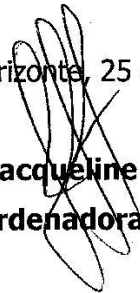
Este certificado expira-se em **23/ 11/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 241/2011**, related to the project entitled "**Characterization of samples Orthobunyavirus group C: phatogenesis viral**", under the supervisors of **Paulo Cesar Peregrino Ferreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 23, 2011**.

This certificate expires in **November 23, 2016**.

Belo Horizonte, 25 de Novembro de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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