

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus *Caraparu*.

FERNANDA CAETANO CAMINI

**OURO PRETO
2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus *Caraparu*.

FERNANDA CAETANO CAMINI

ORIENTAÇÃO: PROF(A) CINTIA LOPES DE BRITO MAGALHÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

**OURO PRETO
2014**

C183a Camini, Fernanda Caetano.
Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus *Caraparu* [manuscrito]. / Fernanda Caetano. – 2014.
99 f.: il. color., grafs., tabs., mapas.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Biologia.
Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Vírus - Teses. 2. Superóxido dismutase - Teses. 3. Antioxidantes - Teses.
I. Magalhães, Cintia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto.
III. Título.

CDU: 578.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus Carapara"

Aos treze dias do mês de fevereiro de 2014, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Fernanda Caetano Camini**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por REPROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Cíntia Lopes de Brito Magalhães
Presidente (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: 13/02/2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Monte do Cruzeiro | CEP: 35430-000 | Ouro Preto - MG - Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1690 | E-mail: cbi@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiw

*Aos meus pais, João Batista e
Maria Marta, por todo amor e apoio
incondicionais!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À professora **Cintia Lopes de Brito Magalhães**, por ser realmente minha “orientadora”, na definição mais abrangente dessa palavra. Pela competência, dedicação e responsabilidade da qual realiza seu trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela vida e por todas as conquistas!

A todos meus familiares e amigos, especialmente meus irmãos, minha avó e meu avô (*in memoriam*), que mesmo sem perceber, sempre me ajudam.

Aos colegas da pós-graduação e da graduação que continuaram comigo, agradeço muito a Andréa e a Laís, que sempre me apoiam, colaborando de alguma forma com este trabalho.

Às companheiras de laboratório Letícia e Carolina pela acolhida e boa vontade em me ajudar e a Priscilla, que juntas contribuíram para que a realização deste trabalho fosse mais produtiva e divertida.

A todos do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos pela boa convivência e troca de conhecimentos: José, Paola, Érica, Cássia, Ana Luiza, Ana Cláudia, Júlia, Rafael, Cyntia, Mariana, Laysa e aos professores Silvana, Breno e Maria Célia.

Aos professores colaboradores da UFOP e da UFMG.

A todos os funcionários e professores da UFOP/ICEB/NUPEB que, de alguma forma, possibilitaram a realização desse trabalho.

RESUMO

O vírus *Caraparu* (CARV) é membro do grupo C do gênero *Orthobunyavirus* (família *Bunyaviridae*). Os vírus do grupo C foram primeiramente descritos na região da Amazônia Brasileira na década de 1950. O CARV foi isolado em 1956 de um macaco sentinela no estado do Pará. Nos países da América do Sul, os bunyavírus do grupo C estão entre os agentes mais comuns de doença febril em humanos e têm causado notáveis surtos nas últimas décadas. Dentre os sintomas da infecção pelo CARV no homem, destacam-se febre, cefaléia, mialgia, náuseas e fraqueza. Já em camundongos, o CARV causa hepatite, o que leva a acreditar que, algum grau de lesão hepática possa também ocorrer nas infecções humanas. Apesar da doença em humanos ser há tanto conhecida, foram poucos os estudos subsequentes pautando esse vírus no que diz respeito a sua patogenia. Estudos têm demonstrado que na patogênese de algumas doenças virais ocorre um aumento no estresse oxidativo, que resumidamente, é um distúrbio no balanço oxidante-antioxidante que pode levar a um potencial dano celular. Muitas células podem tolerar um grau de estresse oxidativo, pois elas possuem antioxidantes tais como a Glutathione, Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT). Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a patogênese hepática do CARV em camundongos e o possível envolvimento do estresse oxidativo e defesas antioxidantes nessa patologia. Após a infecção subcutânea de camundongos BALB/c, o CARV foi detectado no fígado e a histopatologia revelou hepatite aguda. Elevados níveis séricos de aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) e alta expressão hepática da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α) foram encontrados nos animais infectados. A infecção pelo CARV não alterou os biomarcadores de estresse oxidativo, mas aumentou o conteúdo de Glutathione e alterou a expressão e atividade das enzimas SOD e CAT. Este trabalho é o primeiro que mostra alterações na homeostase oxidativa após infecção pelo CARV e, pode, em parte, ajudar a explicar melhor a patogênese hepática deste vírus, assim como a patogênese de outros membros da família *Bunyaviridae*.

ABSTRACT

Caraparu virus (CARV) is a member of Group C of the *Orthobunyavirus* genus (*Bunyaviridae* family). Group C viruses were firstly described in the Brazilian Amazon region during the 1950s. The CARV was first isolated in 1956 from a sentinel monkey in state of Pará. In the countries of South America, bunyavirus Group C are among the common agents of human febrile illness and have caused notable outbreaks in recent decades. Among the symptoms of CARV infection in human stand out fever, headache, myalgia, vomiting and weakness. Already in mice CARV causes hepatitis, which leads to believe that some degree of liver injury may also occur in human infections. Although the disease in humans is already known to a time, few subsequent studies basing this virus regarding its pathogenesis. Studies have shown that in the pathogenesis of some viral diseases there is an increase in oxidative stress that, briefly, is a disturbance in the oxidant-antioxidant balance leading to potential cellular damage. Most cells can tolerate a mild degree of oxidative stress because they have antioxidant molecules such as glutathione, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Therefore, the purpose of this study was to examine the hepatic pathogenesis of CARV in mice and the possible involvement of oxidative stress and antioxidant defenses on this pathology. Following subcutaneous infection of BALB/c mice, CARV was detected in the liver and histopathology revealed acute hepatitis. Increased serum levels of aspartate and alanine aminotransferases (AST/ALT) and greater hepatic expression of the proinflammatory cytokine Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) were found in infected animals. The CARV-infection did not alter the biomarkers of oxidative stress but caused increased GSH content and altered expression and activity of SOD and CAT. This is the first report of an alteration of oxidative homeostasis upon CARV infection, which may, in part, explain the hepatic pathogenesis of this virus, as well as the pathogenesis of other *Bunyaviridae* members.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKBV – Vírus Akabane

APEUV – Vírus Apeu

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

BLMV – Vírus Belém

BRCV – Vírus Bruconha

BSA – Albumina Sérica Bovina

BUNV – Vírus Bunyamwera

CARV – Vírus Caraparu

CAT – Catalase

CCHFV – Vírus da Febre Hemorrágica Criméia -Congo

CEV – Vírus da Encefalite da Califórnia

CHIKV – Vírus Chikungunya

CMC – Carboximetilcelulose

CTFV – Vírus da Febre do Carrapato do Colorado

CYP – Citocromo P450

DENV – Vírus da Dengue

EEEV – Vírus da Encefalite Equina Oriental

ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FC – Teste de Fixação de Complemento

GCS - γ -glutamilcisteína sintetase

GLV – Vírus Gumbo Limbo

GPx – Glutaciona Peroxidase

GR – Glutaciona Redutase

GROV – Vírus Garoa

GSSG – Glutaciona Oxidase

GST – Glutaciona S-transferase

G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C
HI – Inibição da Hemaglutinação
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-1 – Vírus Linfotrópico Humano de Células T
IFN-I – Interferon tipo 1
ITQV - Vírus Itaquí
JEV – Vírus da Encefalite Japonesa
LACV – Vírus La Crosse
MADV – Vírus Madrid
MAGV – Vírus Maguari
MAYV – Vírus Mayaro
MEM – Meio Mínimo de Eagle
MTBV – Vírus Marituba
MURV – Vírus Murutucu
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NEPV – Vírus Nepuyo
NO – Óxido Nítrico
NRIV – Vírus Ngari
NSs – Proteína não-estrutural do segmento S
NSm - Proteína não-estrutural do segmento M
NT – Ensaio de Neutralização
OROV – Vírus Oropouche
OSSAV – Vírus Ossa
ORIV – Vírus Oriboca
pi – pós-infecção
POWV – Vírus Powassan
RdRp – RNA polimerase RNA dependente
RESV – Vírus Restan
RNP – Ribonucleocapsídeo
RRV – Vírus Ross River
RSV – Vírus Respiratório Sincicial
RVFV – Vírus da Febre do Vale do Rift

SBV – Vírus Schmallerberg

SFB – Soro Fetal Bovino

SINV – Vírus Sindbis

SLEV – Vírus da Encefalite de St. Louis

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Substâncias Reativas as Ácido Tiobarbitúrico

TBEV – Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alpha

UFP – Unidade Formadora de Placa

VEEV – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

VINV – Vírus Vínices

YFV – Vírus da Febre Amarela

ZIKV – Vírus Zika

WEEV – Vírus da Encefalite Equina Ocidental

WHO – Organização Mundial de Saúde

WNV–Vírus West Nile

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Família <i>Bunyaviridae</i> : gêneros, sorogrupos e principais exemplos	8
Tabela II – Principais vírus do gênero <i>Orthobunyavirus</i>	15
Tabela III – Algumas espécies reativas e suas meias-vidas	20
Tabela IV – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	39
Tabela V – Biomarcadores de estresse oxidativo	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico dos arbovírus	4
Figura 2. Exemplos de surtos causados por arbovírus no mundo	6
Figura 3. Distribuição geográfica de alguns principais bunyavírus	10
Figura 4. Morfologia dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	11
Figura 5. Ciclo de multiplicação dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	13
Figura 6. Localização dos arredores da capital Belém (Pará, Brasil)	18
Figura 7. Formação de EROs e mecanismos de defesa	27
Figura 8. Evolução do peso corporal dos animais	45
Figura 9. Atividade sérica de AST e ALT	46
Figura 10. Histopatologia e imunohistoquímica	48
Figura 11. Morfometria de células inflamatórias	49
Figura 12. Expressão relativa do mRNA de TNF- α	50
Figura 13. Dosagem de glutatona total	51
Figura 14. Expressão relativa dos mRNAs de SOD1, SOD2 e SOD3	53
Figura 15. Expressão protéica da SOD1e Beta actina	54

Figura 16. Atividade total da SOD	55
Figura 17. Expressão relativa do mRNA da CAT	56
Figura 18. Expressão protéica da CAT e da Beta actina	57
Figura 19. Atividade total da CAT	58
Figura 20. Representação esquemática da infecção pelo CARV	65

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
1.Introdução	1
2.Revisão Bibliográfica	3
2.1. Arbovírus	3
2.2. Família <i>Bunyaviridae</i>	7
2.3. Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	14
2.4. Sorogrupo C: o vírus <i>Caraparu</i>	16
2.5. Estresse Oxidativo	19
2.5.1. Defesas Antioxidantes	22
2.5.2. Estresse Oxidativo e Doenças Virais	28
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. Material e Métodos	31
4.1. Animais e amostra do vírus <i>Caraparu</i>	31
4.2. Delineamento experimental	31
4.3. Dosagem da atividade de AST/ALT.....	32
4.4. Histopatologia, Imunohistoquímica e Contagem de células inflamatórias	32
4.5. Dosagem de TBARS	33
4.6. Dosagem de proteínas totais (Método de Lowry)	33
4.7. Dosagem de proteína carbonilada	35
4.8. Dosagem de glutathiona total	36
4.9. Dosagem da expressão gênica das enzimas SOD1, 2 e 3 e CAT e TNF- α	38
4.9.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA	38
4.9.2. PCR em tempo real	39
4.10. Análise da expressão protéica de SOD1 e CAT	40
4.10.1. Extração das proteínas totais do fígado	40

4.10.2. Western Blot	40
4.11. Dosagem da atividade total de SOD e CAT	41
4.11.1. SOD total	41
4.11.2. Catalase	43
4.12. Análise Estatística	44
5. Resultados	45
5.1. Evolução da doença e sinais clínicos	45
5.2. Níveis séricos de ALT e AST	45
5.3. Análise histopatológica, Imunohistoquímica e Morfometria	47
5.4. Expressão gênica do TNF- α	49
5.5. TBARS e Proteína Carbonilada	50
5.6. Glutathiona total	51
5.7. Expressão gênica da SOD1, SOD2 e SOD3	51
5.8. Expressão protéica da SOD1	52
5.9. Atividade total da SOD	55
5.10. Expressão gênica da CAT	55
5.11. Expressão protéica da CAT	56
5.12. Atividade total da CAT	58
6. Discussão e Conclusão	59
Referências Bibliográficas	66
Anexos	79

1 - INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, muitas viroses emergentes preocupam as autoridades sanitárias, pois surgem como importantes problemas de saúde pública em áreas urbanas e também em áreas rurais. Alterações no ecossistema e principalmente no comportamento humano podem propiciar essas viroses, que afetam toda a sociedade. Uma virose emergente hoje já consolidada na humanidade é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que ocorre praticamente em todo o mundo. Dentre outras, as viroses emergentes que também causam preocupação são aquelas transmitidas por vetores artrópodes, uma vez que apresentam grande capacidade de disseminação e para muitas não há tratamento específico e/ou vacinas disponíveis (Ministério da Saúde, 1998).

Os arbovírus (vírus transmitidos por picada de um artrópode) são mantidos em equilíbrio nas florestas, através de ciclos envolvendo artrópodes e vertebrados silvestres. O avanço da civilização para essas áreas resulta em desflorestamentos, uso indevido do subsolo, construção de represas e rodovias e crescimento urbano desorganizado e não sustentável, expondo a população a um número considerável de agentes infecciosos emergentes. Exemplos de arboviroses que emergiram no Brasil devido ao desflorestamento ocorreram no estado do Pará na década de 1950. Naquela época, houve um intenso recrutamento de trabalhadores de outros estados com o intuito de desmatar a floresta nativa e transformá-la em grandes plantações. Durante essas atividades foram reportados inúmeros surtos e epidemias virais à cercania da capital, Belém, sendo relevantes os números de casos atribuídos aos arbovírus, dentre eles os bunyavírus do Grupo C. O vírus Caraparu (CARV BeAn 3994), um bunyavírus do Grupo C e objeto de estudo deste trabalho, foi isolado em 1956 na floresta de Utinga, do soro de macacos *Cebus apella*, e mais tarde de seres humanos e de artrópodes, sendo denominado pelo nome do primeiro paciente do qual foi isolado (Causey *et al.*, 1961).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que os bunyavírus do Grupo C se limitavam à região Amazônica brasileira. No entanto, sabe-se hoje que sua distribuição é subestimada tendo em vista o isolamento do CARV fora dos arredores da Amazônia. Desse modo, o aparecimento de vírus emergentes do Grupo C não seria surpreendente, uma vez que outras arboviroses que romperam a fronteira entre o ambiente silvestre e o urbano já foram registradas em nosso meio, como por exemplo, o vírus da dengue, da febre amarela e da febre

do oropouche. Uma das preocupações dos virologistas é justamente a emergência de viroses ainda não devidamente caracterizadas, para as quais não se sabe exatamente a relevância, a patogenia, o tratamento e as formas de controle.

O CARV foi, diversas vezes, isolado dos seres humanos expostos na Amazônia brasileira, causando uma síndrome febril característica. Apesar da doença em humanos ser há tanto conhecida, foram poucos os estudos subsequentes pautando esse vírus no que diz respeito a sua patogenia. Assim, esse trabalho teve como objetivo dar prosseguimento aos estudos envolvendo a patogênese da infecção pelo CARV bem como a resposta do hospedeiro frente à infecção.

Sabendo-se que o estresse oxidativo pode ser fator importante na patologia de diversas doenças virais e a fim de melhor entender os vários aspectos relacionados à patogenia do CARV, nós estudamos, *in vivo*, a patogênese hepática após infecção por este vírus e o possível envolvimento do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes nessa patologia. Para tanto, camundongos BALB/c foram infectados com o CARV e eutanasiados diferentes dias pós-infecção. Os animais infectados desenvolveram sinais de doença e as alterações histopatológicas encontradas no fígado bem como o aumento de AST/ALT foram condizentes com hepatite aguda. Alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo não foram evidenciadas pelas técnicas usadas, mas alterações significativas foram encontradas no “status” antioxidante no fígado dos animais infectados. Esse foi o primeiro trabalho mostrando a relação entre estresse oxidativo e defesas antioxidantes na patogênese de um bunyavírus do Grupo C, bem como o primeiro trabalho nesse sentido com um vírus do gênero *Orthobunyavirus*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Arbovírus

O termo “arbovírus” origina-se da expressão inglesa *arthropod-borne*, acrescida da palavra vírus. Eles constituem o maior grupo conhecido de vírus, com mais de 500 membros registrados no “International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates”. Possuem um genoma constituído por RNA, com exceção do vírus da febre suína africana, que possui o genoma com DNA. O genoma de RNA dos arbovírus pode ser segmentado ou não e apresentar-se com uma ou mais fitas (Monath, 1988). Os arbovírus com genomas não segmentados estão incluídos nas famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, enquanto aqueles com genomas segmentados incluem-se nas famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Beaty *et al.*, 1988).

Representando quase 30% de todas as doenças infecciosas emergentes na última década, as arboviroses estão distribuídas em todo o mundo (Jones *et al.*, 2008). O que contribui para o aparecimento das arboviroses são algumas variáveis comuns, como fatores sócio-econômicos, ambiental e ecológico, embora cada vírus tenha suas próprias variáveis que colaboram para sua epidemiologia (Morens *et al.*, 2004).

Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos, carrapatos, flebotomíneos (*Phlebotomus*, *Sergentomya* e *Lutzomya*), maruins ou mosquito pólvora (*Culicoides*), percevejos (*Oeciacus*) e possivelmente ácaros. Esses vetores, depois de serem infectados, transmitem esses microorganismos ao se alimentarem do sangue dos hospedeiros vertebrados, especialmente aves e mamíferos roedores. O ciclo se fecha quando novos artrópodes são infectados ao se alimentarem do sangue de vertebrados que apresentam viremia. A transmissão vertical, através da via transovariana, e a transmissão venérea também podem ocorrer (Figura 1) (Who, 1985; Figueiredo, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2009).

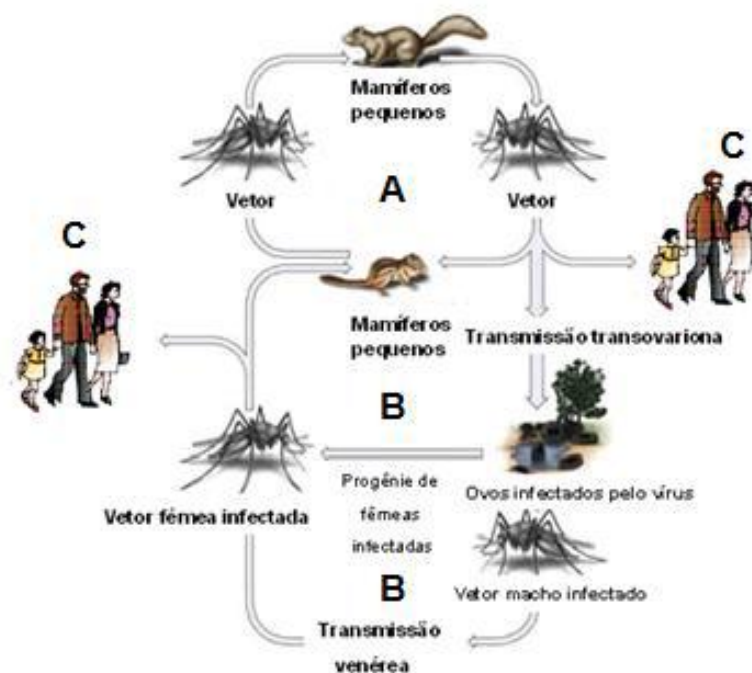


Figura 1: Ciclo biológico dos arbovírus. A – Ciclo de amplificação em mamíferos, no qual a fêmea infectada poderá transmitir o vírus a pequenos mamíferos que desenvolvem uma viremia alta e curta, podendo levar à infecção de artrópodes hematófagos. B – Ciclo reservatório, no qual ocorre a transmissão transovariana e venérea. C – Infecção humana acidental. Fonte: adaptado de <http://www.microbeworld.org>

De acordo com Weaver (2006), o fato do genoma destes vírus serem quase que exclusivamente de RNA pode ser um requisito importante para sua plasticidade em obter sucesso em ambientes de hospedeiros dinâmicos. Estima-se que as taxas de erro da RNA polimerase RNA dependente (RpRd) variam de 10^{-3} a 10^{-5} erros/nucleotídeo/ciclo de replicação (Domingo & Holland, 1994; Drake & Holland, 1999), o que em conjunto com níveis rápidos e elevados de replicação viral permitem a estes vírus uma adaptação melhor e mais rápida aos diferentes ambientes de hospedeiros.

Os arbovírus são classificados em grupos antigênicos constituídos por dois ou mais vírus que demonstram relações antigênicas um com o outro, de acordo com o critério sorológico estabelecido por Casals em 1957 (Cruz & Vasconcelos, 2008). Dessa forma, em relação às propriedades físico-químicas, a maioria dos arbovírus se distribui em cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae*. No entanto, nem todos os membros dessas famílias são necessariamente arbovírus, além disso, reconhece-se ainda a existência de outros arbovírus integrantes das famílias *Arenaviridae*, *Herpesviridae*, *Coronaviridae* e, de muitos outros vírus que não têm taxonomia definida, pois suas

características físico-químicas ainda não são suficientemente conhecidas (Travassos da Rosa *et al.*, 1986).

Mais de 100 espécies de arbovírus possuem capacidade de provocar doença em humanos, sendo responsáveis por significativos problemas de saúde pública em todo o mundo. Entre estes, a maioria são transmitidos por mosquitos, incluindo *flaviviruses*, tais como o *Dengue virus* (DENV), *Yellow fever virus* (YFV), *Zika virus* (ZIKV) e as viroses do sorogrupo de encefalites japonesas como *West Nile virus* (WNV), *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) e o *Japanese encephalitis virus* (JEV); *alphaviruses*, que incluem: *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV) e *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Sindbis virus* (SINV), *Ross River virus* (RRV), e *Chikungunya virus* (CHIKV); e as *bunyaviruses* incluindo o *La Crosse virus* (LACV), *Rift Valley fever virus* (RVFV) e *California encephalitis virus* (CEV). Alguns, tais como *Colorado tick fever virus* (CTFV), *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV), *Louping III virus* (LIV), e *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), são essencialmente, se não exclusivamente, transmitidas por carrapatos (Kuno & Chang, 2005).

Os arbovírus apresentam uma ampla distribuição geográfica, tanto em regiões temperadas como, principalmente, nas tropicais, por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. Nos trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano. Nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). No Brasil, há uma maior concentração de estudos sobre arboviroses na região do estado do Pará, o que leva a uma maior quantidade de arbovírus isolados, não indicando necessariamente uma maior prevalência desses vírus nessa região (Cruz & Vasconcelos, 2008; Vasconcelos, 2009).

A Amazônia brasileira é uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, não só devido às condições climáticas favoráveis, mas também à grande diversidade da fauna e flora. Nessa região, durante os anos de 1954 a 2006, foram isolados pelo menos 196 diferentes tipos de arbovírus, distribuídos em diversas famílias, sendo a maioria de patogenicidade desconhecida ao homem (Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Cruz & Vasconcelos, 2008; Vasconcelos, 2009). Devido a esse desconhecimento sobre a patogênese dos arbovírus, eles constituem sério problema de saúde pública. Como exemplos têm-se o YFV, DENV, vírus Oropouche (OROV), vírus Mayaro (MAYV) e diversos outros agentes responsáveis por doenças em

humanos. O DENV e OROV estão associados à doença humana epidêmica em áreas urbanas e o MAYV e YFV em áreas rurais (Vasconcelos *et al.*, 1998).

Em seus *habitats* naturais, os arbovírus são mantidos em equilíbrio em seu ciclo biológico, porém mudanças ambientais como queimadas, desflorestamentos, urbanização descontrolada, construções de rodovias, entre outras, causam um desequilíbrio nesse ecossistema e expõem a população a emergentes agentes infecciosos. Durante a infecção de múltiplos e distintos organismos, o vírus pode ser selecionado e produzir uma linhagem mais virulenta ou, melhor adaptada (Figueiredo, 2007), contribuindo assim para uma maior probabilidade de epidemias e doenças virais mais frequentes e mais importantes em humanos.

A figura abaixo (Figura 2) mostra algumas importantes epidemias por arbovírus que acometeram a população mundial ao longo dos anos.

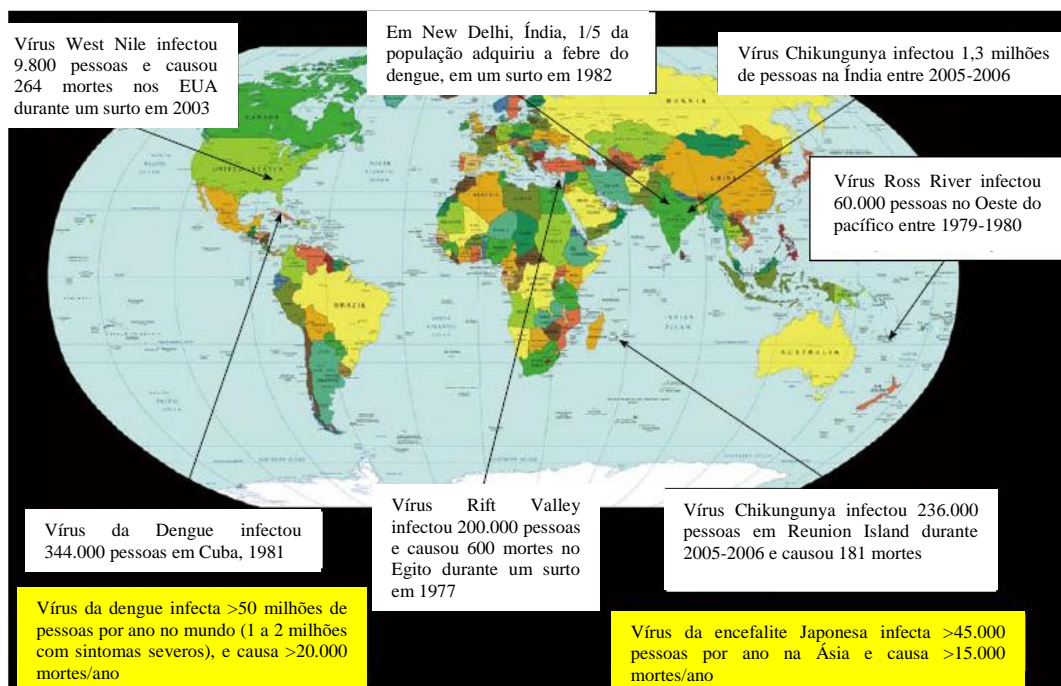


Figura 2: Exemplos de importantes surtos causados por arbovírus no mundo. O diagrama ilustra vários surtos de arbovírus ocorridos em diversas regiões. É provável que nos próximos anos outras partes do mundo sejam afetadas, incluindo as regiões que se encontram fora da zona tropical. Fonte: adaptado de Devaux, 2012.

O homem é hospedeiro acidental e, normalmente, não importante na manutenção dos arbovírus na natureza. O hospedeiro vertebrado silvestre geralmente não fica doente, uma vez que as infecções costumam ser inaparentes. As formas clínicas produzidas em humanos variam conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção e também das condições biológicas do hospedeiro. A maioria apresenta uma evolução benigna, porém alguns podem

causar sérios quadros clínicos que podem culminar na morte ou incapacitação permanente do paciente (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

As manifestações clínicas das arboviroses em humanos são divididas em quatro categorias: febre, febre exantemática, febre hemorrágica e encefalite. Outros sintomas como hepatite, broncopneumonia e conjuntivite também são relatados. A febre apresenta-se, geralmente, com sintomas semelhantes aos da gripe, tais como febre, dor de cabeça, dor retro-orbital e mialgia; a febre exantemática manifesta-se com exantema, poliartralgia e poliartrites; a febre hemorrágica pode apresentar-se clinicamente com petequias espontâneas ou sangramento persistente e choque combinado com uma baixa contagem de plaquetas, aumento das enzimas hepáticas, entre outros; o quadro de encefalite pode manifestar-se como mielite, meningite e/ou encefalite, com alterações comportamentais, paralisia, paresia, convulsões e problemas na coordenação (Pinheiro *et al.*, 1986; Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2003; Henning, 2004; Zacks & Paessler, 2010; Suhrbier *et al.*, 2012).

O que determina cada uma das manifestações clínicas das arboviroses são fatores como inoculo, tempo de exposição, cepa do vírus e fatores do hospedeiro (Gubler, 2002), levando sempre em consideração que essas síndromes em grande parte, se sobrepõem, sendo necessário um diagnóstico baseado em todos os sintomas clínicos e não de um sintoma isolado. Um mesmo arbovírus pode causar diferentes sintomas e, por outro lado, a mesma sintomatologia pode ser causada por diferentes arbovírus.

Dentre os arbovírus, a família *Bunyaviridae* é uma grande família de vírus de RNA que afetam animais e plantas. As rápidas alterações no meio ambiente, com suas diversas implicações, têm mostrado dentro dessa família importantes agentes infecciosos emergentes e re-emergentes (Meltzer, 2012).

2.2 - Família *Bunyaviridae*

Algumas das viroses emergentes e re-emergentes mais importantes pertencem à família *Bunyaviridae*, que foi estabelecida em 1975 (Bishop *et al.*, 1980) e constitui uma das maiores e mais diversificadas famílias virais, sendo a maior em relação aos vírus de RNA. As principais características dos bunyavírus são o genoma de RNA, sítio de replicação citoplasmático e montagem e maturação no complexo de Golgi (Hart *et al.*, 2009). Ainda, possui o maior número de arbovírus conhecidos, incluindo mais de 350 membros, que

compartilham as mesmas características antigênicas, genéticas e ecológicas, distribuídos em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* (Tabela I) (Fauquet *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007). Quatro desses cinco gêneros incluem membros que são agentes causadores de febres hemorrágicas, para as quais, medidas preventivas e terapêuticas ainda não estão disponíveis (Calisher, 1996; Fauquet *et al.*, 2005; Walter & Barr, 2011).

Tabela I. Família *Bunyaviridae*: gêneros, sorogrupos e principais exemplos

Gênero	Sorogrupo	Exemplos
<i>Orthobunyavirus</i>	Anopheles A	Tacaiuma, Virgin River
	Anopheles B	Anopheles B
	Bakau	Bakau
	Bunyamwera	Bunyamwera
	Bwamba	Bwamba
	C	Apeu, Caraparu, Itaqui, Marituba
	California	La Crosse, Tahyna, Snowshoe hare
	Capim	Capim
	Gamboia	Gamboia
	Guama	Guama, Catu
	Koongol	Koongol
	Minatitlan	Minatitlan
	Nyando	Nyando
	Olifantsvlei	Olifantsvlei
	Patois	Patois, Estero Real
	Simbu	Akabane, Oropouche, Ingwavuma
Tete	Bahig, Weldona	
Turlock	Turlock	
<i>Phlebovirus</i>	Sandfly fever	Candiru, Punta Toro, Rift Valley
	Uukuniemi	Uukuniemi
<i>Nairovirus</i>	Crimean-Congo	Crimean-Congo
	Dera Ghazi Khan	Dera Ghazi Khan
	Hughes	Hughes
	Nairobi Sheep	Nairobi
	Qalyub	Qalyub
	Sakhalin	Sakhalin
	Thiafora	Thiafora
<i>Hantavirus</i>	Hantaan	Hantaan, Dobrava, Seoul
	Puumala	Puumala
	Sin Nombre	Sin Nombre, Andes
	Thottapalayam	Thottapalayam
<i>Tospovirus</i>		Tomato spotted wilt

Adaptado de Schmaljohn & Nichol, 2007.

Os bunyavírus estão presentes em todo o mundo e infectam uma ampla gama de hospedeiros invertebrados e vertebrados. Com exceção dos *Hantavirus*, os quais são transmitidos através da inalação de aerossóis de excretas de roedores contaminados, os demais membros da família são transmitidos por mosquitos flebótomos e carrapatos (Figueiredo, 1999). Em adição, outra rota de transmissão, que não inclui vetores, foi descrita para alguns nairovírus e phlebovírus. Estes vírus podem também se difundir por meio do contato com tecidos ou fluidos sanguíneos de animais infectados (Gonzalez-Scarano *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007). A maioria dos orthobunyavírus são patógenos de seres humanos e animais, enquanto que os tospovírus são agentes patogênicos de plantas.

Exemplos de importantes patógenos humanos da família *Bunyaviridae* são o vírus da Febre Hemorrágica Criméia Congo - CCHFV (*Nairovirus*), o vírus La Crosse - LACV (*Orthobunyavirus*) e o vírus da Febre do Vale do Rift - RVFV (*Phlebovirus*), que causam doenças com sintomas que abrangem desde uma leve doença febril até uma forma mais grave, incluindo febre hemorrágica e encefalite (Dionisio *et al.*, 2003; Soldan & Gonzalez-Scarano, 2005). O CCHFV é o segundo arbovírus mais comum em relação à sua importância médica, ficando atrás somente do DENV, sendo endêmico em grande parte da África, da Ásia e da Europa (Hoogstraal, 1979; Ergonul, 2006). Outros importantes bunyavírus foram isolados na Amazônia brasileira como: vírus Guaroa (GROV), vírus Maguari (MAGV), vírus Tacaiuma (TCMV), CARV, OROV, vírus Belém (BLMV) entre outros (Travassos da Rosa *et al.*, 1997). O mais importante deles, do ponto de vista epidemiológico é o OROV, por causar epidemias frequentes na região Amazônica, ficando atrás apenas das epidemias ocasionadas pelo DENV. Além disso, o OROV também circula em países vizinhos (Figueiredo, 1999). Com exceção das vacinas para uso veterinário contra o RVFV, não existem, atualmente, terapêuticas eficazes ou vacinas para bunyavirose. A figura 3 mostra a distribuição geográfica dos principais bunyavírus.

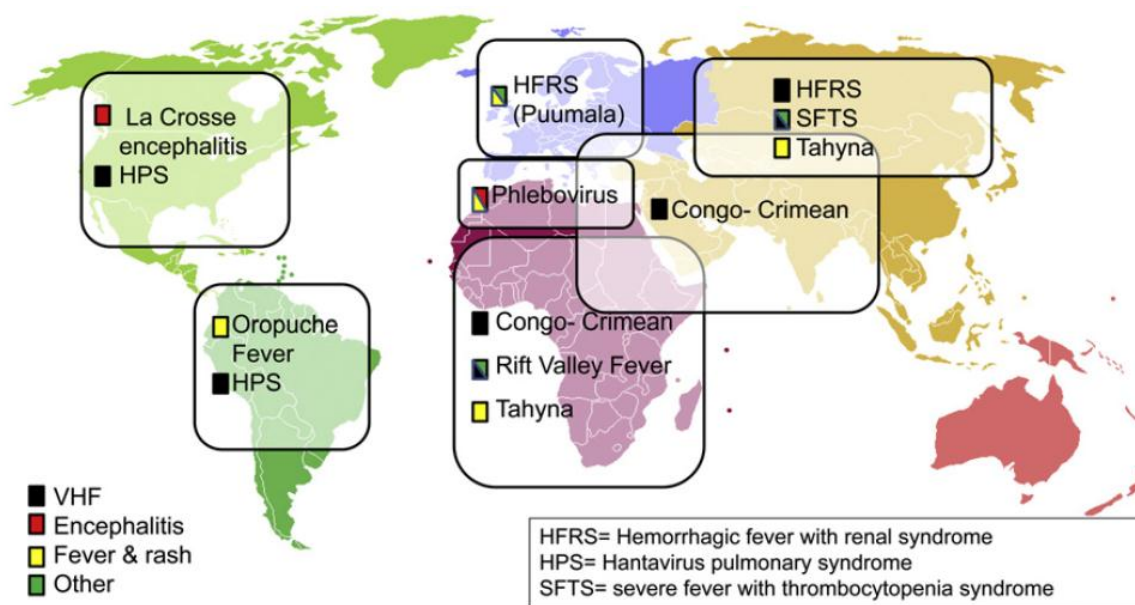


Figura 3: Distribuição geográfica de alguns principais bunyavírus: Adaptado de Meltzer, 2012.

A taxa de infecção clínica para os bunyavírus é pouco definida, mas a maioria das infecções é considerada assintomática. O CCHFV e OROV causam doença clínica em, respectivamente, 25% e 30-60% das pessoas infectadas (Dionisio *et al.*, 2003; Ergonul, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2009). As infecções pelos bunyavirus geralmente apresentam-se como doença febril, mas algumas podem evoluir para formas mais graves como síndrome hemorrágica (CCHFV e RVFV) e síndrome neurológica (LACV) (Dionisio *et al.*, 2003; Ergonul, 2007). As maiores taxas de letalidade são vistas em casos de síndromes hemorrágica ou neurológica, chegando a 30% em infecções pelo CCHFV (Isaacson, 2004; Ergonul, 2007). Um grande número de viroses endêmicas encontradas na África Subsaariana e na América do Sul apresenta-se como doença febril com ou sem artralgia (Fagbami & Tomori, 1981; Aguilar *et al.*, 2010). Isso as torna clinicamente indistinguível de outras infecções comuns, como a malária, febre amarela, dengue e chikungunya.

Com relação à morfologia dos vírus da família *Bunyaviridae*, as partículas são esféricas e envelopadas, medindo cerca de 80 a 120 nm de diâmetro, com projeções glicoprotéicas na superfície do seu envelope (Figura 4). Possuem em sua composição química 2% de RNA, 58% de proteínas, 33% de lipídeos e 7% de carboidratos (Karabatsos, 1985; Schmaljohn & Nichol, 2007). O genoma apresenta cerca de 13Kb e é composto por três segmentos de RNA, fita simples, senso negativo, denominados de acordo com seu tamanho: grande L (“Large”),

médio M (“Medium”) e pequeno S (“Small”) (Lees *et al.*, 1986; Elliott, 1989; Mertz, 1997). Estes três segmentos genômicos estão encapsulados pela proteína N do nucleocapsídeo. Normalmente, os vírus do mesmo gênero compartilham o mesmo comprimento de cada segmento, sendo a organização genética dos segmentos semelhante em todos os gêneros. As sequências complementares 5’ e 3’ terminais (UTR- regiões terminais não traduzidas) formam ligações estáveis, não covalentes, com pareamento de bases, permitindo que os segmentos apresentem-se em forma circular (Schmaljohn & Nichol, 2007; Novella *et al.*, 2012; Doceul *et al.*, 2013).

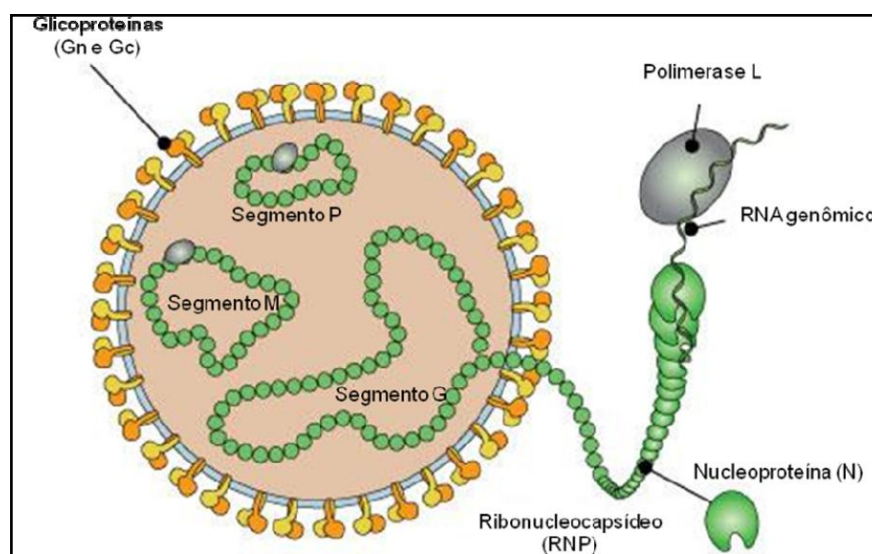


Figura 4. Morfologia dos vírus da família *Bunyaviridae*: Desenho esquemático da estrutura dos bunyavírus. Os três segmentos genômicos (S, M e L) estão complexados com a proteína do nucleocapsídeo N para formar o ribonucleocapsídeo (RNP). O nucleocapsídeo e a polimerase viral L estão empacotados dentro de um envelope lipídico contendo as glicoproteínas Gn e Gc. Fonte: <http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/bunya.gif.&www.stanford.edu/group/virus/bunya/2004mendez>

Uma característica comum entre os bunyavírus é que o segmento L codifica um RNA polimerase RNA dependente (RpRd), responsável tanto pela transcrição quanto pela replicação do genoma viral; o segmento M codifica o precursor das glicoproteínas Gn e Gc, e no caso dos orthobunyavírus e alguns phlebovírus, codifica também uma proteína não-estrutural (NSm); o segmento S codifica as proteínas do nucleocapsídeo N, cuja principal função é encapsular os produtos da replicação viral para formar o complexo ribonucleoprotéico (RNP) e para os orthobunyavírus, phlebovírus e tospovirus, o segmento S também codifica uma proteína não-estrutural (NSs). Em relação a estas proteínas não-estruturais, a NSs apresenta como principal função a modulação da resposta antiviral da célula

hospedeira através de diversas vias da imunidade inata, enquanto que pouco se sabe sobre a exata função da NSm, apenas que ela pode estar envolvida na montagem viral (Shi *et al.*, 2006; Hollidge *et al.*, 2011; de Brito Magalhães *et al.*, 2007; Walter e Barr, 2011; Eifan, 2013).

A infecção dos bunyavírus inicia-se com a ligação do vírus à membrana celular (Figura 5). Tal ligação é realizada pela proteína Gn para células de vertebrados e pela Gc para células de artrópodes. O ciclo de multiplicação ocorre exclusivamente no citoplasma. A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose e a acidificação dos endossomas promove alterações conformacionais em Gn e/ou Gc, facilitando a fusão das membranas viral e celular, permitindo que o vírus libere seu genoma e a polimerase no citoplasma da célula. Uma vez livres no citoplasma, os três segmentos genômicos virais junto à polimerase iniciam o processo de transcrição, gerando o RNA viral de polaridade positiva ou mRNA. A tradução dos segmentos de mRNA L e S ocorre nos ribossomos livres no citoplasma, ao passo que a tradução do mRNA M ocorre nos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso, com posterior glicosilação primária das proteínas nascentes do envelope Gn e Gc (Schmaljohn & Nichol, 2007).

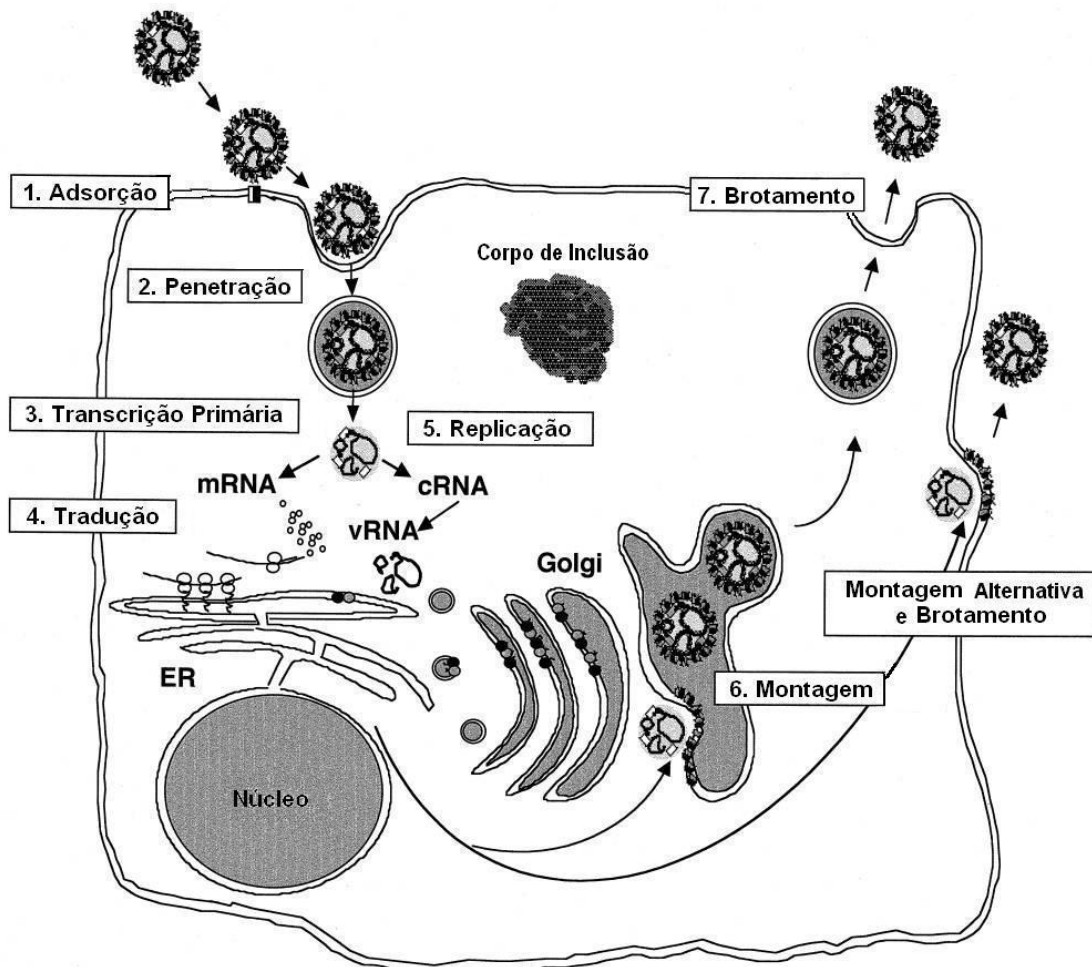


Figura 5: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos vírus da família *Bunyaviridae*. 1- adsorção das partículas virais à superfície da célula; 2- penetração por endocitose seguida por fusão de membrana, permitindo a liberação no citoplasma das ribonucleoproteínas e polimerase virais; 3- transcrição primária; 4- tradução das proteínas virais; 5- replicação do vRNA através de um cRNA intermediário; 6- montagem das partículas no Golgi ou membrana plasmática; 7- brotamento das partículas do Golgi seguida por exocitose ou brotamento pela membrana plasmática. Para vários membros da família, corpúsculos de inclusão são encontrados no citoplasma. ER: retículo endoplasmático. Fonte: adaptado de Schmaljohn & Nichol, 2007.

Os vírions são formados dentro das células por um processo de brotamento do complexo de Golgi, onde adquirem seu envelope. Os nucleocapsídeos nascentes, formados pela proteína N, o RNA viral e a polimerase L, seguem para a etapa de morfogênese, que inclui a acumulação de Gn e Gc no complexo de Golgi, glicosilação terminal dessas glicoproteínas, aquisição de membranas do hospedeiro modificadas e liberação de dentro desse compartimento. As novas partículas virais, formadas no Golgi, são liberadas em vesículas

individuais por exocitose, atingindo o meio extracelular (Figueiredo, 1999; Kochs *et al.*, 2002; Salanueva *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007).

Com relação à patogênese, os membros da família *Bunyaviridae*, de maneira geral, destacam-se não apenas por promoverem importantes infecções no homem, nos animais e plantas, mas também, por causarem grandes epidemias tornando-se um grande problema de saúde pública (Nichol *et al.*, 2000; Le May & Bouloy, 2012). Os bunyavirus apresentam um amplo espectro de sintomas, podendo provocar quatro tipos de síndromes no homem: febre, encefalite, febre hemorrágica e doença respiratória aguda. Algumas bunyaviroses estão associadas com uma doença febril auto-limitante que, embora não fatal, pode ser economicamente significativa devido às horas de trabalho perdidas. Além disso, é importante ressaltar que, a extensão real das doenças ocasionadas pelos bunyavírus não é conhecida, pois, na maioria das vezes esses vírus circulam em regiões onde também ocorrem outras doenças como a malária e a dengue fazendo com que o diagnóstico correto não seja alcançado (Elliott & Weber, 2009).

2.3 - Gênero *Orthobunyavirus*

O gênero *Orthobunyavirus* é o maior dentro da família *Bunyaviridae*, apresenta mais de 170 vírus, agrupados em 48 espécies, sendo o vírus Bunyamwera (BUNV) um protótipo tanto do gênero em questão como para toda a família (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, 2013). Este gênero é dividido em 18 sorogrupos (Tabela II), baseado nas reações cruzadas de ensaios de inibição da hemaglutinação (HI), de neutralização (NT) e fixação do complemento (FC).

De acordo com Hart e colaboradores (2009), pelo menos 30 orthobunyavírus são patogênicos ao homem e, assim como os demais vírus desta família, causam em seus hospedeiros uma variedade de sintomas tais como febre (OROV), encefalite (LACV) ou febre hemorrágica (vírus Ngari - NRIV) (Bouloy, 2001; de Brito Magalhães *et al.*, 2007; Sautto, 2013). O vírus Akabane (AKBV) é responsável por malformações congênitas em ruminantes. O vírus Schmollenberg (SBV), um novo vírus descoberto nas proximidades da fronteira alemã-holandesa e, posteriormente em outros países da Europa, causa uma infecção aguda no gado, ocasionando febre, redução da produção de leite e diarreia (Eifan *et al.*, 2013).

Tabela II. Principais vírus do gênero *Orthobunyavirus*

Sorogrupo	Vírus	Distribuição Geográfica	Doença
Anopheles A	Tacaiuma	América do Sul	Humanos
	Virgin River	América do Norte	Sem Registro
Anopheles B	Anopheles B	América do Sul	Sem Registro
Bakau	Bakau	Ásia	Sem Registro
	Bunyamwera	África	Humanos
Bunyamwera	Cache Valley	América do Norte	Ovelhas, gado e Humanos
	Fort Sherman	América do Sul	Humanos
	Germiston	África	Humanos
	Ilesha	África	Humanos
	Kairi	América do Sul	Cavalos
	Main drain	América do Norte	Humanos
	Shokwe	África	Humanos
	Wyeomyia	América do Sul	Humanos
	Xingu	América do Sul	Humanos
	Bwamba	Bwamba	África
Pongola		África	Humanos
C	Apeu	América do Sul	Humanos
	Caraparu	Américas do Sul e Norte	Humanos
	Itaqui	América do Sul	Humanos
	Madrid	América do Norte	Humanos
	Marituba	América do Sul	Humanos
	Murucutu	América do Sul	Humanos
	Nepuyo	Américas do Sul e Norte	Humanos
	Oriboca	América do Sul	Humanos
	Ossa	América do Norte	Humanos
	Restan	América do Sul	Humanos
	Encefalite California	América do Norte	Humanos
	Guaroa	Américas de Sul e Norte	Humanos
	Inkoo	Europa	Humanos
California	Jamestown Canyon	América do Norte	Humanos
	La crosse	América do Norte	Humanos
	Snowshoe hare	América do Norte	Humanos
	Tahyna(Lumbor)	Europa (África)	Humanos
	Capim	Capim	América do Sul
Gamboa	Gamboa	Desconhecido	Sem Registro
Guama	Catu	América do sul	Humanos
	Guama	Américas do Sul e Norte	Humanos
Koongol	Koongol	Austrália	Sem Registro
Minatitlan	Minatitlan	América do Norte	Sem Registro
Nyando	Nyando	África	Humanos
Olifantslei	Olifantsvlei	África	Sem Registro
Patois	Patois	América do Norte	Sem Registro
	Estero Real	América do Norte	Sem Registro
Simbu	Akabane	África, Ásia e Austrália	Gado
	Ingwavuma	África e Ásia	Porcos
	Oropouche	América do Sul	Humanos
Tetê	Bahig	África, Europa	Sem Regitro
	Weldona	América do Norte	Sem Registro
Turlock	Turlock	Américas do Norte e Sul	Sem Registro

Fonte: Adaptado de Schmaljonh & Nichol, 2007

As orthobunyavíroses são transmitidas, em sua maioria, por mosquitos e utilizam uma extensa gama de hospedeiros vertebrados para ampliação do ciclo de manutenção (Soldan & Gonzalez-Scarano, 2005). A replicação ocorre no citoplasma das células tanto de vertebrados como de invertebrados, com diferentes efeitos. A infecção das células de mamíferos é caracterizada pelo efeito citopático, culminando na morte celular, ao passo que a infecção em células de insetos possui um caráter persistente, uma vez que nenhum efeito citopático pode ser observado (Hart *et.al.*, 2009).

A patogenicidade dos orthobunyavírus depende de múltiplos fatores virais codificados por seus três segmentos genômicos. Por exemplo, a capacidade neuroinvasiva do LACV e de outros orthobunyavírus do sorogrupo California Encephalitis é determinada pela polimerase e/ou pelas glicoproteínas, enquanto que a resposta imune do hospedeiro é inibida pela proteína NSs que antagoniza a expressão do interferon tipo I (IFN-I) e a transcrição mediada pela RNA polimerase II (Gonzalez-Scarano *et al.*, 1988; Endres *et al.*, 1991).

Entre as orthobunyavíroses presentes no Brasil, a mais importante é a febre do OROV, vírus pertencente ao sorogrupo Simbu, que é responsável por grandes epidemias. Contudo, outros orthobunyavírus foram isolados em território nacional e agrupados no sorogrupo C em virtude de suas características antigênicas. Tais vírus apresentam risco de se tornarem emergentes, o que tem despertado o interesse de pesquisadores brasileiros em elucidar os mais diversos aspectos da sua biologia, epidemiologia e patogenicidade.

2.4 - Sorogrupo C: o vírus Caraparu

Os vírus do grupo C foram descritos pela primeira vez na região da Amazônia brasileira, entre os anos de 1954 e 1959. Nessa década de 1950, o estado do Pará, Brasil, recebeu intensa migração de trabalhadores com o objetivo de desmatar a floresta nativa e transformá-la em grandes plantações. Nesse período, foram relatados inúmeros surtos e epidemias virais à cercania da capital, Belém, sendo que os números de casos atribuídos às arbovíroses inespecíficas ou não caracterizadas circulantes foram muito relevantes nessa região (Causey *et al.*, 1961).

Dessa forma, com o intuito de identificar essas arbovíroses, o Laboratório de Vírus de Belém, montado no Instituto Evandro Chagas, em colaboração com a Fundação Rockefeller (Nova Iorque, EUA), isolou e identificou vários tipos de arbovírus circulantes naquela região

da Amazônia brasileira (Figura 6). O projeto iniciou-se em 1954 e os vírus foram isolados de amostras obtidas de pacientes com doença febril, de animais sentinelas, bem como de animais selvagens e artrópodes vetores. Essas amostras foram liofilizadas e, juntamente com os correspondentes anticorpos neutralizantes, enviadas para a Fundação Rockefeller, que realizou estudos de soroneutralização com as amostras brasileiras e de isolados de outras partes do mundo.

No total foram isoladas 451 amostras de arbovírus que foram agrupados em 18 sorogrupos, sendo 11 desses correlacionados ao gênero *Orthobunyavirus*. Dentre os isolados, alguns foram incluídos em sorogrupos já descritos, como o sorogrupo A e B, o Bunyamwera e o California Encephalitis. Sete outros tipos foram divididos entre dois novos sorogrupos, o grupo Guamá, composto por dois sorotipos e o grupo C, composto pelos vírus Apeu, Caraparu, Marituba, Murutucu e Oriboca (Shope *et al.*, 1961).

O grupo C é constituído por 14 vírus distintos isolados a partir de seres humanos, animais selvagens (principalmente roedores, marsupiais e morcegos) e mosquitos (Casals & Whitman, 1961; Pinheiro, 1981; Shope *et al.*, 1988; Casola *et al.*, 2001; de Brito Magalhães *et al.*, 2011). De acordo com a classificação sorológica, os vírus do grupo C podem ser divididos em quatro complexos antigênicos: o complexo Caraparu, que inclui o CARV, vírus Ossa (OSSAV), vírus Apeu (APEUV), vírus Vinces (VINV) e vírus Bruconha (BRCV); o complexo Madrid, que inclui o vírus Madrid (MADV); o complexo Marituba, que inclui os vírus Marituba (MTBV), Murutucu (MURV), Restan (RESV), Nepuyo (NEPV) e Gumbo Limbo (GLV) e o complexo Oriboca, incluindo o vírus Oriboca (ORIV) e o vírus Itaqui (ITQV) (Causey *et al.*, 1961; Shope & Whitman, 1966; Karabatsos, 1985; Coimbra *et al.*, 1998; de Brito Magalhães *et al.*, 2011).

Os vírus do grupo C ocorrem em regiões tropicais e subtropicais das Américas, incluindo os Estados Unidos, México, Panamá, Honduras, Guatemala, Trinidad e Tobago, Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Guiana Francesa (Karabastos, 1985; Shope *et al.*, 1988; Elliott *et al.*, 2000; de Brito Magalhães *et al.*, 2011). São transmitidos por vários vetores da espécie de culicídeos do subgênero *Melanoconion* e também pelas espécies *Culex (Mel) gnomatos* e *Culex (Mel) vomerifer*. Ainda, no Brasil, espécies de *Aedes*, *Coquinettidia*, *Limatus* e *Psoropitro* também são importantes vetores destas arboviroses. Em relação aos hospedeiros vertebrados, os roedores e marsupiais figuram como seus principais reservatórios naturais (Elliott *et al.*, 2000; Turell *et al.*, 2005).

Os vírus do grupo C têm sido associados com doenças humanas, as quais, geralmente, apresentam-se como auto-limitantes, com sintomas parecidos com o DENV, consistindo de febre, dor de cabeça, mialgia, náuseas, vômitos, fraqueza, com duração de dois a cinco dias em média (Pinheiro *et al.*, 1986; Pinheiro & Travassos da Rosa, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1998; de Brito Magalhães *et al.*, 2011).

Em 1956, o CARV (BeAn 3994) foi isolado na floresta de Utinga (Figura 6), do soro de macacos *Cebus apella* e, mais tarde, na mesma região, foi isolado do sangue de trabalhadores florestais febris e artrópodes (Causey *et al.*, 1961). A denominação do vírus refere-se ao nome do primeiro paciente do qual foi isolado.

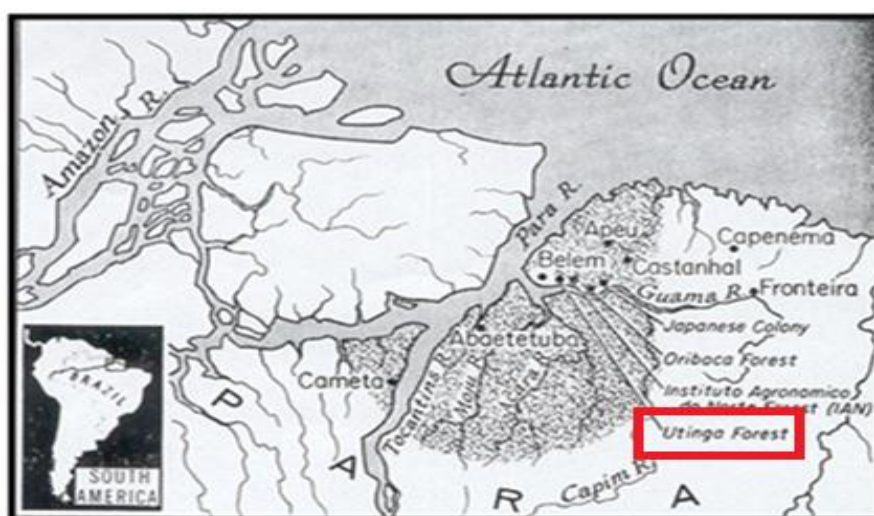


Figura 6: Mapa mostrando a localização de parte do estado do Pará, nos arredores da capital Belém. Toda esta área corresponde à região estudada por Shope e sua equipe, de onde foram isoladas as amostras de arbovírus. O local em destaque representa onde o CARV foi isolado. Fonte: Causey, *et al.*, 1961.

O CARV, apesar de ter sido isolado inicialmente no Pará, foi isolado mais tarde de mosquitos da espécie *Culex sacchettae*, em 1976, na região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo, no sudeste do Brasil. Nessa mesma região, anticorpos anti-CARV foram encontrados em roedores como *Coendou milanurus*, *Akodon*, *Nectomys*, *Oryzomys* e *Oxymecterus*, e marsupiais como *Didelphis marsupialis* (Iversson, 1994). Um caso clínico de um biólogo que conduzia estudos entomológicos no Vale do Ribeira (SP) foi relatado em 1987. Após infectar-se, o paciente apresentou febre alta, cefaléia, mialgia e prostração; após 48 horas, o paciente foi tratado com ácido acetilsalicílico e os sintomas desapareceram (Iversson *et al.*, 1987). Este fato é de grande interesse médico sanitário, pois, até pouco tempo

atrás, acreditava-se que, no Brasil, o CARV limitava-se à região norte, sugerindo uma provável distribuição subestimada.

Em humanos a chamada “febre Caraparu” tem evolução benigna, com duração de quatro a cinco dias e caracteriza-se por febre, cefaléia, calafrios, mialgias, fotofobia, dor retrobulbar e pode estar associada a náuseas e vômitos (Causey *et al.*, 1961; Iversson *et al.*, 1987; Vasconcelos *et al.*, 1992; de Brito Magalhães *et al.*, 2007).

Apesar de já ter sido isolado em humanos e apresentar uma alta soropositividade em moradores da região norte do Brasil, são poucos os estudos pautando o CARV em relação a sua patogenia. Em camundongos, o CARV causa hepatite 4 a 5 dias após a infecção, podendo levar os animais a óbito dependendo da dose viral e idade dos animais (Brinton *et al.*, 1992).

Recentemente tem-se relacionado a ocorrência de múltiplas interações entre doenças virais e espécies reativas de oxigênio (EROs), mostrando que há possibilidade do estresse oxidativo ter um papel importante na patogênese da infecção de muitos vírus, dentre eles, os bunyavirus.

2.5 - Estresse Oxidativo

Compreende-se como radical livre um átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons, ou seja, elétrons desemparelhados, em sua última camada eletrônica, o que o torna instável e altamente reativo, como por exemplo, os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou hidroxil (OH^{\bullet}) (Halliwell & Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992). Os radicais livres têm a capacidade de existir independentemente e apresentam uma vida muito curta. São divididos em quatro categorias principais com base em seu átomo central, sendo eles o oxigênio, nitrogênio, enxofre e cloro (Halliwell e Gutteridge, 2007). Na natureza, duas das substâncias mais importantes que podem gerar os radicais livres é o oxigênio em seu estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que se apresenta como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e é um importante vasodilatador (Moncada *et al.*, 1991; Dusting & Macdonald, 1995; Ignarro, 1998).

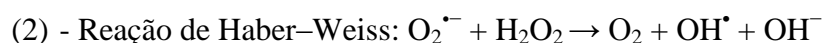
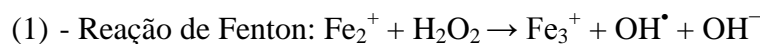
O termo coletivo “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) inclui não somente os radicais livres mas também outros átomos e moléculas que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell, 1992) (Tabela III).

Tabela III. Algumas espécies reativas e suas meias-vidas

Espécie Reativa de Oxigênio	Meia-vida (segundos)
OH [•] Radical hidroxil	10 ⁻⁹
HOO [•] Radical hidroperoxil	10 ⁻⁸
RO [•] Radical alcoxil	10 ⁻⁶
ROO [•] Radical peroxil	7
ONOO [•] Peroxinitrito	0,05 - 1
H ₂ O ₂ Peróxido de hidrogênio	Variável
O ₂ ^{•-} Radical superóxido	Variável
¹ O ₂ Oxigênio singleto	10-5
NO Radical óxido nítrico	1 - 10
HOCl Ácido hipocloroso	Estável

Obs.: R é um lipídeo, por exemplo, o linoleato.
 Fonte: Jordão *et al.*, 1998

O ânion superóxido O₂^{•-}, produzido a partir de processos metabólicos ou por irradiação física que "ativa" o oxigênio, é considerado a ERO "primária", e pode ainda interagir com outras moléculas para gerar as EROs "secundárias", diretamente ou predominantemente através de processos catalisados por enzimas ou metais (Valko *et al.*, 2005). O O₂^{•-} é gerado pela redução de um elétron do O₂. Quando o O₂ é reduzido por dois e três elétrons, são produzidos o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical OH[•] respectivamente. Finalmente, através da redução total do O₂, por quatro elétrons, são produzidas duas moléculas de H₂O (Simic, 1988). A espécie reativa mais nociva é o radical hidroxil OH[•], que é gerado pelas reações de Fenton (1) e de Haber-Weiss (2), na presença de um metal de transição, geralmente ferro (Fe) ou cobre (Cu). Apresenta uma alta reatividade, o que o torna muito perigoso, além de possuir uma meia vida muito curta *in vivo*, de aproximadamente 10⁻⁹ segundos (Pastor *et al.*, 2000).



De acordo com Beckman & Ames (1997), as EROs são formadas em resposta a estímulos extracelulares e intracelulares. Estima-se que uma célula humana é exposta a cerca de 1,5×10⁵

acessos oxidativos por dia, a partir de radicais hidroxil e outras espécies reativas. Entre os eventos que geram essas espécies reativas tem-se como o principal a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, onde do total de O₂ mitocondrial consumido, cerca de 1% a 3% é desviada para a formação de EROs, e este desvio, acredita-se, ser tecido e espécies dependente (Ames *et al.*, 1993; Halliwell & Cross, 1994). Outras importantes fontes de EROs incluem o sistema do citocromo P450, enzimas oxidantes, como a xantina oxidase endotelial, NAD(P)H oxidases e mieloperoxidases (Bedard & Krause, 2007; Altenhofer, 2012; Kleikers *et al.*, 2012). Assim como as reações de auto-oxidação de substâncias endógenas como catecolaminas, ou substratos exógenos como os xenobióticos, bem como a oxidação de produtos reduzidos acumulados, por exemplo, nos processos do metabolismo anaeróbico, ou ainda, pelo grupo heme das proteínas (Kovacic *et al.*, 2005; Lenaz, 2012).

As variadas reações dos radicais livres em geral podem levar à formação de complexos com proteínas, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, formação de produtos de oxidação de tióis, peróxidos lipídicos, polímeros, epóxidos, endoperóxidos e produtos de cisão, como alquenais e hidroalquenais, que são citotóxicos. Algumas dessas reações podem afetar a atividade enzimática (Halliwell & Cross, 1994).

Os efeitos benéficos das EROs ocorrem em concentrações baixas/moderadas e envolvem funções fisiológicas em respostas celulares, como por exemplo, a defesa contra agentes infecciosos, sistemas de sinalização intracelular e indução de resposta mitogênica. Como efeitos prejudiciais, as EROs causam potenciais danos biológicos, através do chamado estresse oxidativo, que afeta estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, proteínas e ácidos nucleicos (Kovacic & Jacintho, 2001; Valko *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2007; Ridnour *et al.*, 2005). Normalmente, isto ocorre em sistemas biológicos quando há uma superprodução de EROs de um lado e uma deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de outro lado.

Uma definição clássica de estresse oxidativo é a de Helmut Sies (1985), onde o estresse oxidativo “é um desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes, em favor dos oxidantes”, mas esse conceito de “equilíbrio” implica que os sistemas biológicos respondam da mesma forma para uma diminuição de pró-oxidantes e um aumento de antioxidantes. Entretanto, múltiplos sistemas estão envolvidos, tais como sinalização redox, o que nos leva a acreditar que esses sistemas não respondem da mesma maneira aos oxidantes e antioxidantes, uma vez que existem muitos estudos que mostram que os antioxidantes tornam-se pró-oxidantes em

algumas condições. Dessa forma, um conceito mais atual sobre “uma ruptura/desregulação da sinalização e controle redox”, proposta por Jones (2006) é uma definição mais abrangente de estresse oxidativo (Silva, 2011).

Sabe-se que os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídeos insaturados nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidados formados são fatores que influenciam o tipo de resposta de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo (Jordão *et al.*, 1998).

O excesso de EROs produzido pode causar danos ao DNA, lipídeos e proteínas levando à perda da integridade e funcionalidade celular. Esse dano oxidativo acumula durante o ciclo de vida, e acredita-se que desempenha um papel chave no desenvolvimento de doenças dependentes da idade tais como o câncer, arteriosclerose, artrite, doenças neurodegenerativas, distúrbios entre outras (Halliwell & Gutteridge, 1999). Dessa forma, para evitar a formação de EROs, a neutralização e o reparo dos danos ocasionados por elas, existe um sistema de defesa antioxidante que, sob condições fisiológicas, não permite ação prejudicial excessiva das EROs (Nakashima *et al.*, 2003; Forman & Dickinson, 2004; Armogida *et al.*, 2012).

2.5.1 - Defesas Antioxidantes

O termo antioxidante tem sido definido como "qualquer substância que, quando presente em concentrações baixas, em comparação com as de um substrato oxidável (cada molécula orgânica encontrada *in vivo*) significativamente atrase ou impeça a oxidação do referido substrato" (Halliwell & Gutteridge, 1999). Porém, em certos casos, esta definição é inadequada, como por exemplo, a albumina plasmática, que é considerada um importante antioxidante por se ligar ao cobre e proteger alvos extracelulares como as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) contra o dano oxidativo. Entretanto, a albumina apresenta-se em excesso molar em comparação às LDLs (Halliwell, 1996). Dessa forma, a melhor definição de antioxidante é “qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo” (Halliwell & Gutteridge, 2007). Observa-se que mesmo a nível fisiológico, não há uma total prevenção na formação/atuação das EROs. A eficácia do sistema

antioxidante depende da molécula geradora do estresse oxidativo e da sua localização, intra ou extracelular.

O sistema de defesa antioxidante se divide em enzimático e não-enzimático. Entre os antioxidantes não-enzimáticos, a grande maioria deles, com exceção dos antioxidantes de baixo peso molecular, são obtidos de fontes dietéticas, que são classificados em várias classes, das quais os polifenóis são a maior. As outras classes incluem as vitaminas C, E (α -tocoferol), carotenóides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (Ratnam *et al.*, 2006).

Os antioxidantes enzimáticos são produzidos endogenamente e fazem parte de um complexo sistema de detoxificação de três fases, altamente conservado entre os eucariotos (Xu *et al.*, 2005; Sarkadi *et al.*, 2006). Endobióticos lipofílicos ou xenobióticos são solubilizados através da modificação por enzimas, como a citocromo P450 (CYP) e desidrogenases/reduases de cadeia curta (SDRs). Estas enzimas usam NAD ou NADP como cofator para adicionar um grupo reativo, como o radical hidroxil. Isso permite que compostos tóxicos sejam excretados, mas pode também produzir compostos reativos nocivos (Sarkadi *et al.*, 2006). Os danos ao DNA, RNA e às proteínas ocorrem se estas moléculas reativas não forem metabolizadas pelas enzimas de fase 2 (Vermeulen *et al.*, 1996).

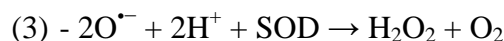
As enzimas de fase 2 além de defenderem as células contra compostos gerados na fase 1 também agem sobre as EROs produzidas endogenamente. Elas englobam um grupo diverso constituído de enzimas que metabolizam radicais livres, reparam estruturas celulares ou conjugam diretamente xenobióticos e lipídeos peroxidados (Sarkadi *et al.*, 2006). Os antioxidantes dessa fase incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), γ -glutamylcisteína sintetase (GCS), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (Christofidou-Solomidou & Muzykantov, 2006).

Na última fase de detoxificação, os conjugados tóxicos são bombeados para fora da célula por transportadores cassetes de ligação de ATP (Transportador ABC) ou outros transportadores (Sarkadi *et al.*, 2006).

Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). As superóxido dismutases são metaloenzimas que protegem os alvos do ataque do ânion superóxido em até 97%. Elas são a primeira e mais importante linha do sistema de defesa enzimático. Estão presentes essencialmente em todas as células do corpo e atualmente existem em três isoformas: a citoplasmática, Cu/ZnSOD (ou

SOD1), a mitocondrial, MnSOD (ou SOD2) e a extracelular, Cu/ZnSOD (ou SOD3) (Perry *et al.*, 2010).

Todas as isoformas da SOD agem por um mecanismo comum de dismutação do ânion superóxido, produzindo o peróxido de hidrogênio, que é menos potente em relação àquele, como mostra a equação de redução (3):



Outra enzima importante que participa do sistema de defesa antioxidante é a Catalase. Uma proteína homotetramérica (240kDa), presente em células de plantas, animais e bactérias aeróbicas, mas a sua concentração é mais elevada em eritrócitos e no fígado (Masters *et al.*, 1986). A Catalase está localizada principalmente nos peroxissomos, mas também na mitocôndria e no núcleo. A enzima promove a conversão de peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular, sendo de grande importância, uma vez que impede a formação do radical OH^{\bullet} que é muito prejudicial. Além disso, demonstrou-se que as atividades da Catalase e SOD apresentam uma correlação linear com o tempo de vida em mamíferos (Cutler, 1984). A catalase apresenta uma das mais altas taxas de rotatividade para todas as enzimas, sendo que uma molécula de catalase pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio a cada minuto (Valko *et al.*, 2006), de acordo com a reação (4):



A catalase é mais eficaz quando há concentrações elevadas de H_2O_2 , em baixas concentrações deste composto ou outros peróxidos, o sistema de defesa da glutathiona entra em ação.

A Glutathiona é um tripeptídeo linear (γ -glutamil-cisteinil-glicina), sintetizada a partir do glutamato, cisteína e glicina. É o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos, sua concentração é de aproximadamente 2mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente (Joseph *et al.*, 1997). Constitui um sistema de defesa endógeno muito importante que tem sido implicado na modulação imune e em respostas inflamatórias (Deneke & Fanburg, 1989; Droge *et al.*, 1994). Entre estes eventos incluem a modulação da

sinalização redox, regulação da proliferação celular, apoptose e respiração mitocondrial (Evans *et al.*, 1991; Brown, 1994).

Na célula, cerca de 90% da Glutathione está localizada no citoplasma, 10% na mitocôndria e uma pequena porcentagem no retículo endoplasmático (Hwang *et al.*, 1992). Aproximadamente 85% da Glutathione celular total está livre, enquanto que o resto está ligado às proteínas (Sies, 1999).

A glutathione é sintetizada no meio intracelular (exceto em células epiteliais) em duas etapas. Na primeira, a síntese envolve a formação de glutamil-cisteína a partir do glutamato e da cisteína em uma reação dependente de ATP e catalisada pela γ -GCS (γ -glutamil-cisteína-sintetase), que requer Mg^{2+} ou Mn^{2+} como cofator. Esta é considerada uma etapa limitante, pois, depende da biodisponibilidade da cisteína e da atividade da γ -GCS, que é inibida por feedback pela glutathione reduzida (GSH) (Meister & Anderson, 1983). Na segunda etapa, a glutathione sintetase (GS) adiciona glicina ao glutamil-cisteína para formar a glutathione (γ -glutamil-cisteinil-glicina). Caso a conversão da glutamil-cisteína em glutathione seja insuficiente, uma reação alternativa predomina: a conversão à 5-oxoprolina catalisada pela γ -glutamilciclotransferase (Kanzok *et al.*, 2000). A produção excessiva de 5-oxoprolina ocorre em casos de deficiência hereditária da glutathione sintetase e é caracterizada por 5-oxoprolinúria, acidose metabólica crônica e distúrbios neurológicos. A biossíntese da GSH pode ser inibida pela butionina sulfoximina (BSO), um inibidor com estrutura similar a um intermediário ativado na reação catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase (Andricopulo *et al.*, 2006).

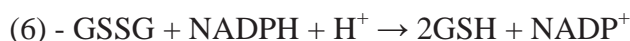
A Glutathione se apresenta, em mais de 98% do seu total, como Glutathione reduzida (GSH) e o restante na forma de Glutathione oxidada (GSSG). A GSH é convertida a GSSG pela Glutathione peroxidase (GPx), durante períodos de estresse oxidativo e é revertido para a forma reduzida pela Glutathione redutase (GR). A razão GSH/GSSG é utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos sendo crucial na manutenção da homeostase intracelular (Rotruck *et al.*, 1972; Meister & Anderson, 1983).

A Glutathione está presente na maioria das células e é o grupamento tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidril (-SH), presente na cisteína. O fígado sintetiza a Glutathione e a sua forma exógena pode ser absorvida no intestino, além disso, ela pode ser sintetizada *de novo*, sendo então um antioxidante exógeno e endógeno (Fang *et al.*, 2002).

As Glutationas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que incluem três enzimas dependentes de selênio e uma peroxidase independente desse elemento. Podem ser divididas em dois grupos, celulares e extracelulares. Em geral, a Glutationa peroxidase é uma proteína tetramérica (85 kDa) e requer 4 átomos de selênio vinculados como porções seleno-cisteína que conferem a atividade catalítica. A GPx reduz o H₂O₂ à H₂O, oxidando a Glutationa (Kinnula *et al.*, 1995), conforme a reação (5):



A redução da forma oxidada da Glutationa (GSSG) é catalisada pela GR. Esta enzima não age diretamente na remoção das EROs, porém é responsável pela regeneração da Glutationa na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da Glutationa (Halliwell & Gutteridge, 1989) (reação 6):



Essa capacidade de reciclar a Glutationa faz com que esse ciclo seja essencial para o mecanismo de defesa antioxidante da célula e evite o esgotamento dos tióis celulares (Heffner & Repine, 1989), sendo que para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão GSH/GSSG deve ser mantida em níveis altos (Sies & Moss, 1978; Halliwell & Gutteridge, 2007). Para isso, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração da Glutationa. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da Glutationa também fica afetada, pois a GSH não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante coadjuvante (Slekar *et al.*, 1996). Além disso, a Glutationa pode através da glutaciona-S-transferase (GST) detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído), hidroxialdeídos, cetoaldeídos- α,β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos que são gerados durante a peroxidação lipídica.

Assim, a Catalase e a GPx reduzem o H₂O₂ à H₂O, uma vez que o aumento do H₂O₂ inativa lentamente a SOD. Portanto, a Catalase e a GPx, ao reduzir o H₂O₂ conserva a SOD e

esta, reduzindo o superóxido, por sua vez, conserva a Catalase e a GPx. Baixos níveis da Catalase, GPx e SOD, assim como, de superóxido e peróxido de hidrogênio, são então mantidos por um mecanismo de feedback, em organismos normais (Rahman *et al.*, 2006), que pode ser melhor visualizado em conjunto na Figura 7.

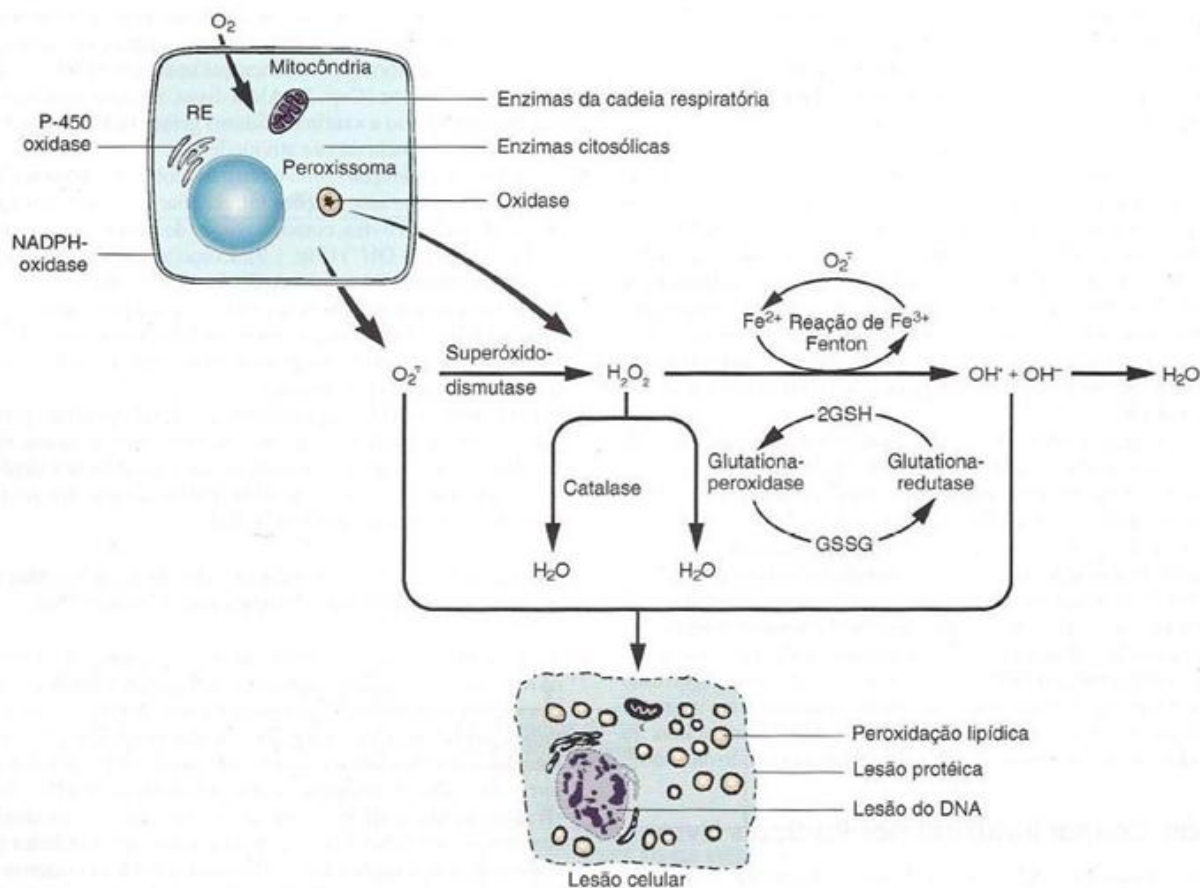


Figura 7: Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos. O O_2 é convertido em $O_2^{\cdot-}$ por enzimas oxidativas no retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomas e citosol. O $O_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 por dismutação e, daí em OH^{\cdot} pela reação de Fenton catalizada por Cu^{2+}/Fe^{2+} . O H_2O_2 também é derivado diretamente de oxidases nos peroxissomas. Outro radical potencialmente lesivo não é mostrado: o oxigênio singleto. A resultante lesão por radicais livres dos lipídeos (peroxidação), proteínas e DNA acarreta várias formas de lesão celular. Repare que o superóxido catalisa a redução de Fe^{3+} em Fe^{2+} , aumentando assim a geração de OH^{\cdot} pela reação de Fenton. As principais enzimas antioxidantes são a SOD, CAT e GPx. GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; NADPH, forma reduzida de fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida.

Fonte.: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Super%C3%B3xido+Dismutase&lang=3

2.5.2 - Estresse Oxidativo e Doenças Virais

Como visto, as espécies reativas estão intimamente envolvidas na regulação do metabolismo e na fisiologia celular, o que é muito relevante no contexto das doenças infecciosas causadas pelos vírus, os quais dependem dos mecanismos de biossíntese das células do hospedeiro. Assim, sabe-se que baixos níveis de EROs ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica-se melhor em células que estão proliferando (Peterhans, 1997a, b). No entanto, com o progresso da infecção, mais EROs são formadas afim de conter a multiplicação viral, levando a um aumento na produção dessas espécies que culmina com o estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro.

Dessa forma, o estresse oxidativo tem surgido como fator chave na progressão da patogênese causada por diversos agentes etiológicos virais, como o vírus da hepatite C (HCV), vírus influenza, HIV, DENV, vírus respiratório sincicial (RSV), vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-1), o vírus da hepatite B (HBV) e o phlebovírus RVFV (Dröge *et al.*, 1994; Akaike *et al.*, 1996; Schwarz, 1996; Peterhans, 1997, a e b; Gil *et al.*, 2002; Stehbens, 2004; Abel *et al.*, 2009; Hosakote *et al.*, 2009; Seet *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Pal *et al.*, 2010; Hosakote *et al.*, 2011; Narayanan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Já foi demonstrado que a infecção em fagócitos pelos vírus influenza e paramyxovirus ativa a geração do ânion superóxido por um mecanismo que envolve a interação entre as glicoproteínas da superfície viral e a membrana plasmática do fagócito (Peterhans, 1997a, b). Além disso, humanos infectados com o HIV estão sob atuação constante do estresse oxidativo, com alterações nas defesas antioxidantes, incluindo alterações no ácido ascórbico, carotenóides, SOD e Glutathione, assim como níveis séricos elevados de hidroperóxidos e malondialdeído (aldeído mais abundante gerado pelo ataque dos radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares), contribuindo para a progressão da doença (Droge *et al.*, 1994; Peterhans, 1997a; Coaccioli *et al.*, 2010).

Nas hepatites virais, como aquelas causadas pelo HCV e HBV, a produção de espécies reativas contribui para o aparecimento de carcinoma hepatocelular, um tumor visto depois de anos de inflamação crônica do fígado. Antioxidantes e agentes que diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias podem ser um complemento útil dos antivirais específicos, no tratamento dessas doenças virais (Peterhans, 1997a; Machida *et al.*, 2006; Wang & Weinman, 2006; Abel *et al.*, 2009; Darvesh & Bishayee, 2010; Pal *et al.*, 2010;).

A infecção de células epiteliais das vias aéreas pelo RSV também induz a produção de EROs (Casola *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Em camundongos infectados, o RSV induz estresse oxidativo nos pulmões, e o tratamento antioxidante melhora os sinais clínicos e a inflamação pulmonar (Castro *et al.*, 2006).

Em casos humanos de infecção pelo DENV, diversos estudos apontam alterações no estado redox que contribuem para a patogênese da doença. Além disso, alguns marcadores do dano oxidativo apresentam-se alterados durante as diferentes fases da infecção, fase febril e fase convalescente, podendo funcionar como marcadores da evolução da doença (Gil *et al.*, 2004; Klassen *et al.*, 2004; Seet *et al.*, 2009).

Diante dessas e outras evidências crescentes de que as espécies reativas estão relacionadas com o agravamento da patogênese de uma variedade de doenças virais (gripe, dengue, AIDS, hepatite e doenças respiratórias), aliado ao fato de que não existem na literatura trabalhos pautando os bunyavirus em relação ao estresse oxidativo causado, esse trabalho teve como objetivo investigar a patogênese do CARV em camundongos, através da avaliação da modulação da homeostase celular oxidativa. O estudo foi realizado no fígado, uma vez que, em camundongos, está demonstrado que esse é um órgão alvo da infecção e sítio ativo da replicação viral e, ainda não se sabe o efeito da patogênese causada em humanos.

Elucidar os mecanismos inflamatórios frente à infecção pelo CARV, ampliar os conhecimentos sobre os aspectos relacionados à sua patogênese bem como abrir perspectivas frente ao uso de antioxidantes como moduladores do estresse oxidativo e potencial abordagem farmacológica, são de primordial importância, visto ser essa doença um problema de saúde pública e potencialmente de caráter emergente.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Caracterizar um modelo murino de hepatite desencadeada pelo vírus *Caraparu* e avaliar o envolvimento do estresse oxidativo e defesas antioxidantes nessa patologia.

3.2 - Objetivos Específicos

- Em soro de camundongos infectados ou não com o vírus *Caraparu* e eutanasiados 3, 7 e 14 dias pós-infecção, avaliar:
 - I – A função hepática através da dosagem sérica de alanina e aspartato aminotransferases (ALT/AST);
- Em fígado de camundongos infectados ou não com o CARV e eutanasiados 3, 7 e 14 dias pós-infecção, avaliar:
 - II - As alterações decorrentes da infecção no fígado por histopatologia e imunohistoquímica;
 - III – O número de células inflamatórias no fígado por morfometria;
 - IV – A expressão gênica da citocina pró-inflamatória TNF- α ;
 - V – Os biomarcadores de estresse oxidativo: TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - peroxidação lipídica) e Proteína Carbonilada (oxidação protéica).
 - VI – Os níveis de Glutathione Total;
 - VII – A expressão gênica das isoformas da Superóxido Dismutase SOD1, SOD2 e SOD3 e da enzima Catalase;
 - VIII – A expressão protéica da SOD1 e da Catalase por Western Blot;
 - IX – A atividade total das enzimas SOD e CAT.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais e amostra do vírus *Caraparú*

Foram utilizados 48 camundongos da linhagem BALB/c adultos jovens (5-6 semanas de vida) provenientes do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/Fiocruz) de Belo Horizonte, Minas Gerais. Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Uso em Animais (CEUA) da UFOP (comprovante em anexo, página 79). O CARV (BeAn 3994 - ATCC) foi gentilmente cedido pelo Prof. Paulo César Peregrino Ferreira (UFMG) com título de 10^6 UFP/mL.

4.2 - Delineamento experimental

Os 48 camundongos foram divididos em três grupos (grupos I, II e III), contendo 16 animais em cada. Oito animais de cada grupo foram infectados via subcutânea com 100 μ L do CARV, contendo 10^5 UFP. Os outros oito animais de cada grupo (animais controle) foram inoculados via subcutânea com 100 μ L de Meio Mínimo de Eagle (MEM, Cultilab) sem Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab).

As injeções foram feitas com o auxílio de uma seringa de tuberculina (BD Plastipak 0,38 x 13- 27,5 G1/2). Todos os animais foram mantidos em gaiolas com sistema de microisolador. Após as injeções, os camundongos foram observados diariamente com relação aos sinais clínicos de doença.

Os animais do grupo I foram eutanasiados após 3 dias, os dos grupo II após 7 dias, e o grupo III após 14 dias. Antes da eutanásia, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (Ketamina® 10% Agener União) e cloridrato de xilazina (Kensol® Cloridrato de xilazina 2% König). A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical. O sangue total foi coletado por punção cardíaca para posterior obtenção do soro. O fígado de cada animal foi obtido e colocado separadamente em tubos, em banho de gelo e então conservados em freezer -80°C até o momento do uso. Todo procedimento foi feito em capela de fluxo laminar com auxílio de material cirúrgico estéril.

4.3 - Dosagem da atividade da aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT)

Para determinação da função hepática, níveis séricos de AST e ALT foram mensurados, utilizando-se os kits Labtest # 52 e 53 (Minas Gerais, Brasil), de acordo com recomendações do fabricante.

4.4 - Histopatologia, Imunohistoquímica e Contagem das células inflamatórias

Amostras de fígado foram fixadas em solução de formol 10% em PBS e depois embebidas em parafina. Em seguida, cortes dos blocos contendo os tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E) (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) para estudos histopatológicos. Ainda, para análises imunohistoquímicas, cortes parafinados foram desparafinados em xilol, hidratados em álcool, lavados em PBS por 5min e então incubados em água oxigenada 3,5% por 30min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação com soro normal de cabra a 7% por 30min a temperatura ambiente. Após o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram lavados com PBS e incubados por 18h a 4°C com fluido ascítico murino contendo anticorpo anti-arbovírus do grupo C-I (NIH), na diluição 1:1000, feita em PBS contendo 0,4% Triton X-100. Após incubação com anticorpo primário, secções dos tecidos foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas 90min à temperatura ambiente com anticorpo secundário biotinilado (DAKO, NIH), em seguida lavadas com PBS e tratadas com o anticorpo terciário contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (DAKO, NIH) por 60min à temperatura ambiente. Secções foram então lavadas em PBS contendo 3',3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) (0,05%) e peróxido de hidrogênio (0,03%). As secções foram lavadas com PBS e coradas com H&E. A contagem de células inflamatórias no parênquima hepático foi feita em secções histológicas de fígado, coradas em H&E, com o auxílio do fotomicroscópio Leica DM5000 e o programa Leica Qwin Image Processing and Analysis Software (Germany).

4.4 - Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A determinação da concentração de TBARS foi baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico em se ligar a lipídeos oxidados. Essa dosagem foi realizada conforme descrito por Buege & Aust (1978).

PREPARO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

100mg do fígado foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato, pH 7,4 e em seguida centrifugados por 10min à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

PROCEDIMENTO DE DOSAGEM

Em um tubo foram colocados 500µL do homogeneizado, 250µL de ácido tricloroacético (TCA) 28% dissolvido em HCl 0,25N, 250µL de ácido tiobarbitúrico 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125µL de BHT (hidroxi tolueno butilado) 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho maria a 95°C por 15min. Após esse período, o tubo foi centrifugado por 10min a 10000g. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a 535nm, sendo primeiro zerado com água destilada.

CÁLCULOS

A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, segundo a lei de Lambert Beer. Usualmente essa concentração é representada em nmoles por mg de proteína. Para se obter a concentração de TBARS em relação a concentração de proteínas totais no fígado, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry.

4.6 - Dosagem de proteínas totais em tecidos (Método de Lowry)

PRINCÍPIO DA TÉCNICA

O método de dosar proteína Lowry foi descrito a primeira vez por Lowry e colaboradores (1951). O método de Lowry é baseado nas ligações das proteínas, que em meio alcalino, com

os íons cobre (Cu^{2+}) formando uma cor azul que é dependente em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, já que os íons cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

REAGENTES

- Reagente A: foram dissolvidos 0,25g de sulfato de cobre e 0,5g de citrato de sódio em 100mL de água destilada. A solução foi armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.
- Reagente B: foram dissolvidos 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. A solução foi armazenada a temperatura ambiente.
- Reagente C: foi adicionado 1mL do reagente A em 50mL do reagente B. Preparado na hora do teste.
- Reagente D: foi dissolvido um 1mL de Folin-Ciocateau em 1mL de água destilada. Preparado na hora do teste.

CURVA PADRÃO

Foram realizados quatro pontos para a curva, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μL de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,15mg/mL.

P3- 715 μL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,35mg/mL.

P4- 25 μL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,5mg/mL.

PROCEDIMENTO DE DOSAGEM

Em um tubo de polipropileno, foram pipetados 10 μL de amostra ou padrão e completados para 100 μL com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μL de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foram adicionados em cada tubo, 100 μL do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

CÁLCULOS

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorvância do padrão (Eixo X). Após regressão linear, foi determinada a equação da reta com a seguinte característica: Concentração = a X Absorvância + b. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenato de tecido. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.7 - Dosagem de Proteína Carbonilada

PRINCÍPIO DA TÉCNICA

A oxidação de proteínas por EROs leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonílica foi realizada conforme descrito por Levine e colaboradores (1994).

PREPARO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

200mg do fígado foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 50mM, pH 6,7, contendo EDTA 1mM. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10000g, por 10min à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

PROCEDIMENTO DE DOSAGEM

Para cada amostra foram utilizados dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Foram transferidos 500µL de homogeneizado de fígado para cada tudo. Em seguida, foram adicionados aos tubos 500µL de TCA 10% e misturados no vórtex. Logo após, os tubos foram centrifugados à 5000g por 10min à 4°C. O próximo passo foi adicionar ao tubo A 500µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e ao tubo C 500µL de HCl à 2,5M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30min, e a cada 15min foram misturados no vórtex. Em seguida, foram adicionados 500µL de

ácido tricloroacético (TCA) 10% em cada tubo, misturados no vórtex e centrifugados à 5000g por 10min à 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante dos tubos foi descartado e 1mL de mistura de etanol com acetato de etila foi adicionado aos tubos e misturado no vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida, o sobrenadante dos tubos A e C foram descartados e à estes foi adicionado mais 1mL da mistura etanol e acetato de etila, misturados no vórtex e novamente centrifugados. No final das centrifugações, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionado em ambos 1mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10min à 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e transferidos para cubeta, onde foram lidos no espectrofotômetro à 370nm.

CÁLCULOS

A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando a seguinte equação de Lambert Berr: $A = C.b.\varepsilon$

Onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ε é o coeficiente de extinção molar. O conteúdo de proteína carbonílica foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹ e expresso por nmol de proteína carbonilada formada por mg de proteína. Para se obter a concentração de proteína carbonilada em relação a concentração de proteínas totais no fígado, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry, como descrito no item 4.6.

4.8 - Dosagem de Glutathiona total

PRINCÍPIO DA TÉCNICA

O kit utilizado foi Sigma # CS0260. A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutathiona oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.

PREPARO DOS REAGENTES DE ESTOQUE

- Solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%.
- Tampão fosfato 5X (500mM), contendo 5mM EDTA.
- Solução padrão estoque de glutatona: 0,3mg de glutatona reduzida em 0,1mL de água destilada.
- Solução de estoque de DTNB: 8mg de DTNB foram diluídos em 5,33mL de dimetil sulfosalicílico (DMSO), resultando em uma solução com 1,5mg/mL de concentração.
- Estoque de NADPH (solução de 40mg/mL).

PREPARO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

100mg de tecido foram homogeneizados com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado a 10000g, por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

- Solução de enzimas diluída: Diluir 15,2µL de glutatona redutase (100unidades/mL) em 250µL de tampão fosfato 1x.
- Solução de NADPH de trabalho: Da solução de estoque de NADPH preparada retirar 30µL para 7,5mL de tampão fosfato 1x.
- Mistura de trabalho: 8mL de tampão 1x, 228µL da solução de enzimas diluída e 228µL de DNPH solução de estoque.
- Solução padrão de glutatona – preparar para a curva padrão: Diluir 10µL de solução estoque de glutatona padrão com 2mL de ácido SSA 5%.

PROCEDIMENTO PARA DOSAGEM

A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Os reagentes e a seqüência de adições estão descritas nas tabelas abaixo.

PROCEDIMENTO PARA CURVA PADRÃO

Poço	1	2	3	4	5
[GSH] μM	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μL)	50	25(tubo 1)	25(tubo 2)	25(tubo 3)	25(tubo 4)
SSA 5% (μL)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μL de amostra	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

PROCEDIMENTO PARA O TESTE

	Amostra	SSA 5%	Mistura de trabalho
Branco	-	10 (μL)	150 (μL)
Padrão (tubos preparados para a curva)	10 (μL)	-	150 (μL)
Amostra	10 (μL)	-	150 (μL)

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μL de NADPH foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorvâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos, no leitor de ELISA à 412 nm.

CÁLCULOS

Foi feito um gráfico utilizando os pontos obtidos na curva padrão (estes pontos obtidos foram o delta das absorvâncias). Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutathiona total em 10 μL de amostra, e este valor convertido para 1mL de amostra.

4.9 - Expressão gênica das enzimas SOD1, SOD2, SOD3 e Catalase e do TNF- α **4.9.1- Extração do RNA total e síntese do cDNA**

Cerca de 50mg do fígado foram utilizados para extração do RNA total, utilizando-se o kit RNAagents® Promega - Total RNA Isolation System (Madison, EUA), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Reino Unido) e estocado a -80°C até o uso. Para a síntese do cDNA, 2 μg do RNA total foram usados como molde e as reações feitas para um volume final

de 20µL, utilizando-se a enzima MultiScribe™ (50U/µL) e oligos randômicos (GeneAmp® RNA PCR, Applied Biosystems, EUA), nas concentrações indicadas pelo fabricante.

4.9.2- PCR em tempo real (qRT-PCR)

O nível de expressão do mRNA das enzimas SOD1, SOD2, SOD3, CAT e TNF-α foram avaliados pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os cDNAs obtidos pela RT-PCR foram usados como moldes nas reações de PCR em tempo real, que foram realizadas com o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendações do fabricante. As reações foram feitas a 95°C 15seg e 60°C 1min, 40 vezes. O aparelho ABI 7300 Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado e os valores de ΔCt foram corrigidos pelo valor do gene normalizador GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). O valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para expressão dos resultados.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores são mostradas abaixo (Tabela IV) e foram desenhadas com base nas sequências de nucleotídeos do organismo *Mus musculus*, disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabela IV. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplificado e número de acesso no GenBank

Gene	Foward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Amplicon	GenBank
SOD1	CTGGGCGCCTTCCATCCGT	ACTGGTTCACCGCTTGCCCTTCTG	173 pb	XM_921976
SOD2	CCAGGATGCCGCTCCGTTATGC	TACACGACCGCTGCTCTCCTCAG	179 pb	NM_013671
SOD3	CCATTTGCTGACCACTCCCCCG	GCACCTGTCAGGCTCTCCCAAGA	168 pb	NM_011435
Catalase	GTCTCACGTTCCGCAGCTCTGC	CTCCTATTGGGTCCCCGCCTCC	150 pb	NM_009804
TNF-α	CGCGACGTGGAAGTGGCAGAA	TTGGGGACCGATCACCCCGA	156 pb	NM_013693
GAPDH	TGCCAGCCTCGTCCCGTAGA	ACTGTGCCGTTGAATTTGCCGT	197 pb	BC_145810

4.10 – Análise da expressão protéica das enzimas SOD1 e CAT

4.10.1- Extração das proteínas totais do fígado

Para a extração de proteínas totais, 30mg do fígado foram homogeneizados com 1mL do tampão de lise (100 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1% de Triton X-100, 0.2 mM de EDTA, 20% de glicerol v/v, 200 mM de NaCl, 1 mM de NaVO₃, 1 mM de PMSF, 5 µg/ml de aprotinina, 2.5 µg/ml de leupeptina, 50mM de NaF e 1 mM de DTT), deixada em repouso sobre o gelo durante 10min e o lisado foi então clarificado dos restos celulares por centrifugação a 10000g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi alíquotado para dosagem das proteínas totais pelo método de Bradford e para armazenamento a -80°C até o momento do uso.

4.10.2- Western Blot

Após a determinação da concentração de proteínas em cada amostra pelo método de Bradford, foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS(PAGE) 12%, a 60V/100V por 2:30 horas, amostras contendo 10µg de proteínas. Em seguida, transferiu-se para membrana de nitrocelulose, por 1:20 horas, usando o Mini Trans-Blot Eletrophoretic Tranfer Cell (Bio-Rad, Brazil). As membranas foram então bloqueadas por uma hora, a temperatura ambiente, utilizando-se PBS 1x contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado. A seguir, as membranas foram lavadas três vezes, de cinco minutos cada, em PBS1x, contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário, em PBS1x contendo 5% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de Tween-20.

Os anticorpos primários usados foram para a SOD1: anti-SOD1 policlonal de coelho diluído 1:1000 (Catálogo número sc-11407, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e para a Catalase: Anti-CAT monoclonal de coelho diluído 1:1000 (Catálogo número ab-76110, ABCAM). Após incubação overnight, as membranas foram lavadas novamente e incubadas por 1h, a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário bovino anti-coelho (utilizado para SOD e CAT) conjugado à peroxidase (Catálogo número sc-2370, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), na diluição de 1:3000, em PBS1x contendo 5% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) e 0,1% de Tween-20. Em seguida, uma última seção de lavagens em PBS/Tween 20 e, as membranas foram então incubadas com solução reveladora

“ECL-Plus” usando um sistema de detecção de quimioluminescência como descrito nas instruções dos fabricantes (Catálogo número W1015, Promega, Madison, WI, USA), por 3 minutos e expostas contra filme de raio-X (*Kodak*) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (*Kodak*).

Após a detecção de um bom resultado, as membranas foram lavadas com PBS/Tween 20, três vezes de cinco minutos e bloqueadas novamente por uma hora, a temperatura ambiente, utilizando-se PBS 1x contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado, em seguida, lavadas da mesma maneira e incubadas overnight a 4°C com o anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina diluído 1:2000 (Catálogo número A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Após incubação overnight, as membranas foram lavadas e incubadas por 1h, a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário de camundongo conjugado a peroxidase, diluído 1:5000 (Catálogo número A4416, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e, seguindo o descrito acima, as membranas foram reveladas.

A análise Densitométrica da intensidade das bandas do Western blot foi realizada usando o System Alpha Innotech by Alpha View Analise software V.3.0.0.0.

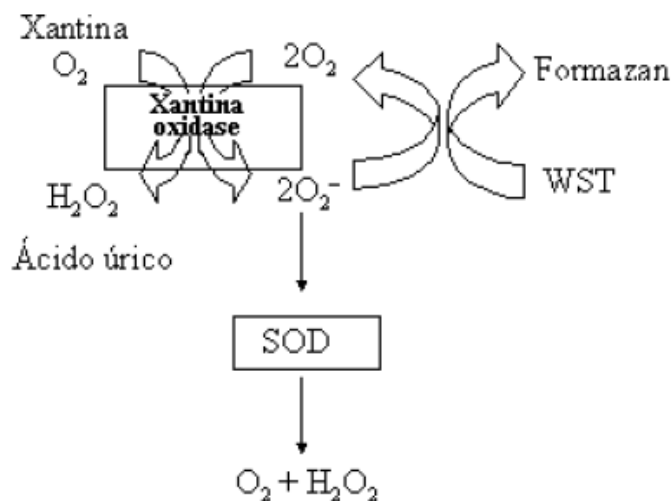
4.11 – Dosagem da atividade total das enzimas SOD e CAT

A atividade enzimática da SOD total e CAT foram analisadas através de ensaios bioquímicos, utilizando kits específicos.

4.11.1 - SOD total:

PRINCÍPIO DA TÉCNICA

O kit utilizado foi o Cayman Chemical Company (MI, USA), o qual usa um sistema de geração de ânions superóxido, xantina e xantina oxidase, e avalia a capacidade da solução teste, sob condições padrões, em inibir a reação do ânion superóxido com o WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio). Esta reação quando ocorrida forma um composto denominado formazan, o qual absorve luz a 450nm.



PREPARO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

100 mg do fígado foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

REAGENTES

- WST (solução de trabalho): foi diluído 1mL de WST em 19mL de solução tampão.
- Solução de enzima de trabalho: diluídos 15 μ L da solução da enzima com 2,5mL do tampão diluído.

PROCEDIMENTO DE DOSAGEM

Em uma placa de ELISA, a dosagem foi feita conforme o quadro abaixo:

	Amostra	Branco 1	Branco 2	Branco 3
1. Amostra	20 μ L	-	20 μ L	-
2. H ₂ O destilada	-	20 μ L	-	20 μ L
3. WST de trabalho	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
4. Enzima de trabalho	20 μ L	20 μ L	20 μ L	-
5. Tampão diluído	-	-	-	20 μ L

Esta placa de ELISA foi incubada por 20min a 37°C e em seguida as absorbâncias das amostras foram lidas a 450nm em leitor de ELISA.

CÁLCULOS

Atividade de SOD (velocidade de inibição) = $\frac{((A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}}) - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco2}}))}{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}})} \times 100$. Portanto, a atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada por sua habilidade, contida na amostra, em inibir a reação do ânion superóxido com o WST.

4.11.2 - Catalase

PRINCÍPIO DA TÉCNICA

O ensaio é baseado na capacidade da enzima CAT, presente na amostra converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984).

PREPARO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

100 mg do fígado foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como amostra biológica.

PROCEDIMENTO DE DOSAGEM

Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50 μ L de tampão fosfato pH 7,2 (0,1mM) e 40 μ L de água destilada, o qual foi mantido em banho maria a 30°C por 1min. Em seguida, foram adicionados 10 μ L da amostra e 900 μ L de H_2O_2 (10mM). A solução foi homogeneizada, o espectrofotômetro zerado com H_2O_2 (10mM) em 240nm e as absorbâncias das amostras foram medidas exatamente a cada minuto, durante cinco minutos.

CÁLCULOS

Sabe-se que 1U de catalase equivale a hidrólise de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Aebi, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em Unidade por mL de amostra e é calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada nessa expressão foi o delta obtido das cinco absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial / 4).

4.12 - Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 3.0 software. As diferenças entre os grupos infectados e controles foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05, através do teste t-Student. Alterações entre os grupos infectados pelo CARV foram analisadas pelo teste de variância Univarida (ANOVA-*one way*) com o pós teste de Tukey para determinar as diferenças entre os grupos.

5 - RESULTADOS

5.1 - Evolução da doença e sinais clínicos

Com o objetivo de avaliar se os camundongos infectados desenvolveram doença, todos os animais foram observados em relação aos sinais clínicos duas vezes por dia, durante os 14 dias do experimento. Os sinais clínicos começaram a aparecer nos animais infectados, a partir do 2º e 3º dia, dentre eles perda de peso (Figura 8), piloereção, tremores e prostração. A perda de peso foi mais acentuada no 3º dia pi, sendo que a partir do 9º dia, nenhum sinal clínico foi evidenciado e nenhum dos animais veio a óbito.

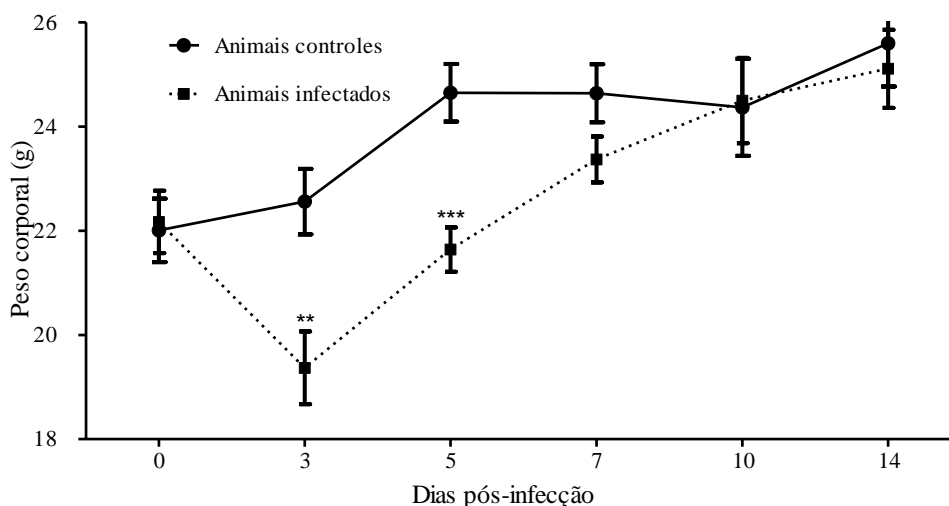


Figura 8: Evolução do peso corporal dos camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. O peso corporal de animais controles e infectados foram registados em diferentes dias após a inoculação. Dados expressos como a média \pm desvio padrão (n = 8 por grupo). (***) $p < 0,0005$, (**) $p < 0,005$, teste t-Student).

5.2 - Níveis séricos das aminotransferases hepáticas

Para testar a função hepática, ou seja, se a infecção pelo CARV poderia causar algum dano ao fígado, foram dosados os níveis séricos das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT), que está presente nos hepatócitos e quando há lesão celular ela atinge a corrente sanguínea podendo assim, ser mensurada; e da Aspartato Aminotransferase (AST) que tem função

similar à ALT, mas além das células hepáticas está presente em hemácias, músculos esqueléticos e cardíacos.

Os níveis dessas enzimas foram mensurados em diferentes dias e apresentaram-se elevados no soro dos animais infectados nos dias 3 e 7 pi. No 14º dia pi, os níveis dessas enzimas foram compatíveis aos dos animais controles (Figura 9a, b).

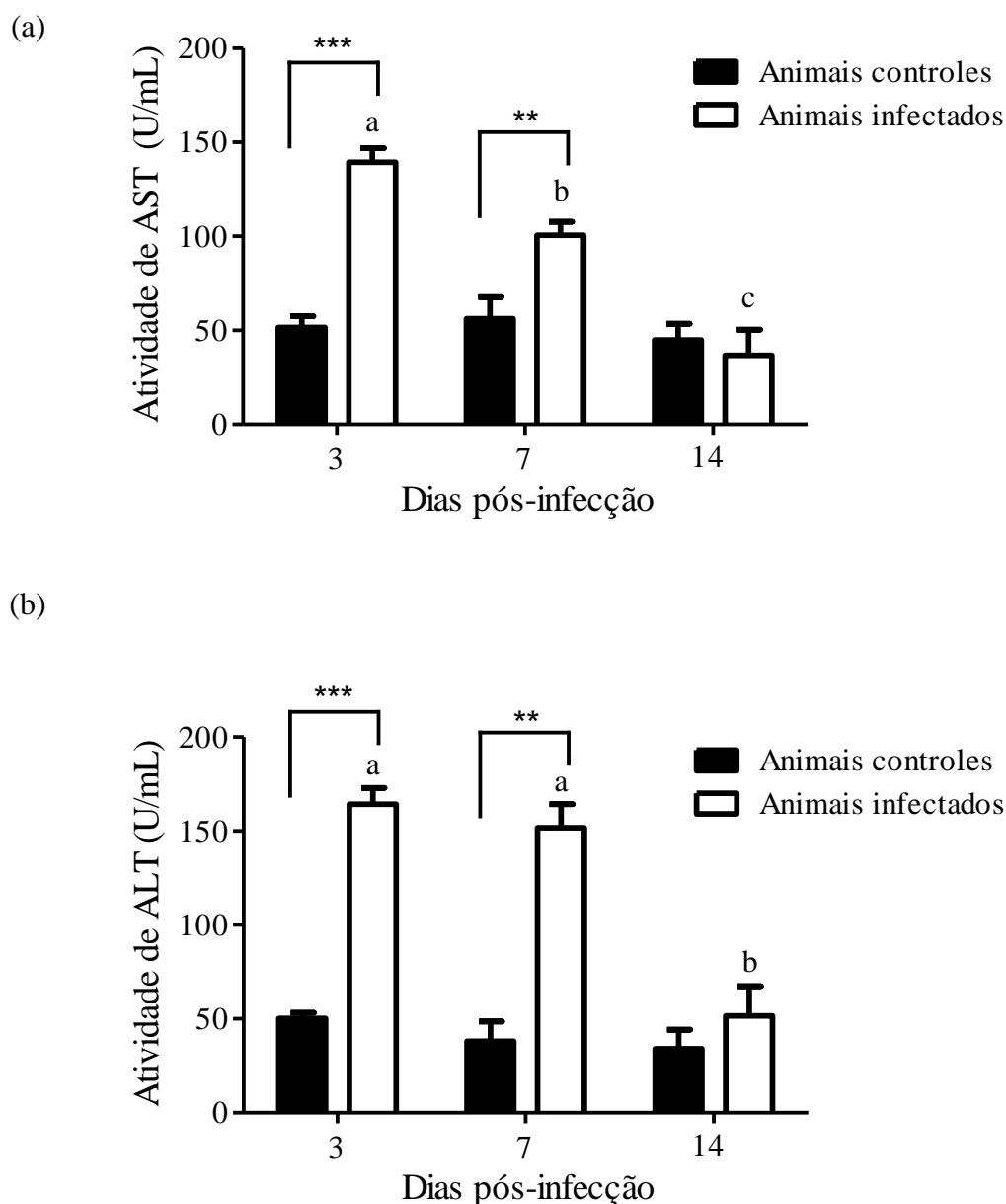


Figura 9: Atividade de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em soro de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. (A) Atividade da AST. (B) Atividade da ALT. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão, onde $***p < 0,0005$ e $**p < 0,005$ (teste t-Student). Letras a, b, c representam diferenças entre os grupos dos animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.3 - Análise Histopatológica, Imunohistoquímica e Morfometria

Para melhor analisar o efeito hepático da infecção pelo CARV nos camundongos, foi feita a histopatologia do fígado, que mostrou, nos animais infectados dos dias 3 e 7, um processo inflamatório moderado multifocal, em áreas de parênquima e espaço porta, com predomínio de células mononucleares (Figura 10b, e). Ainda, foram observados hiperemia de grau moderado nos vasos sanguíneos e quadro sugestivo de esteatose microvesicular (Figura 10b, e). As alterações histopatológicas foram mais intensas no 7º dia pi (Figura 10e). Nos animais dos grupos controles (Figura 10a, d, g) e infectados 14 dias (Figura 10h), o quadro histológico foi compatível com a normalidade, sugerindo que no 14º dia após infecção o tecido hepático já conseguiu reverter os danos causados pela infecção.

Assim, para correlacionar as alterações histopatológicas com a presença do vírus, ensaios de imunohistoquímica foram realizados. Uma imunocoloração positiva citoplasmática foi detectada no parênquima hepático de todos os animais infectados, nos diferentes dias (Fig. 10c, f, i). Uma coloração mais intensa foi observada no parênquima hepático dos animais infectados no 3º dia pi (Figura 10c). Provavelmente a maior imunorreatividade aos antígenos virais observada nesse dia deveu-se a presença de ativa replicação viral, desde que, através da titulação de vírus foi possível recuperar partículas virais infectivas somente no 3º dia pi, com título viral médio de 10^6 UFPU/g de tecido. No parênquima hepático dos animais controles não houve imunorreatividade para o antígeno do CARV (dados não mostrados).

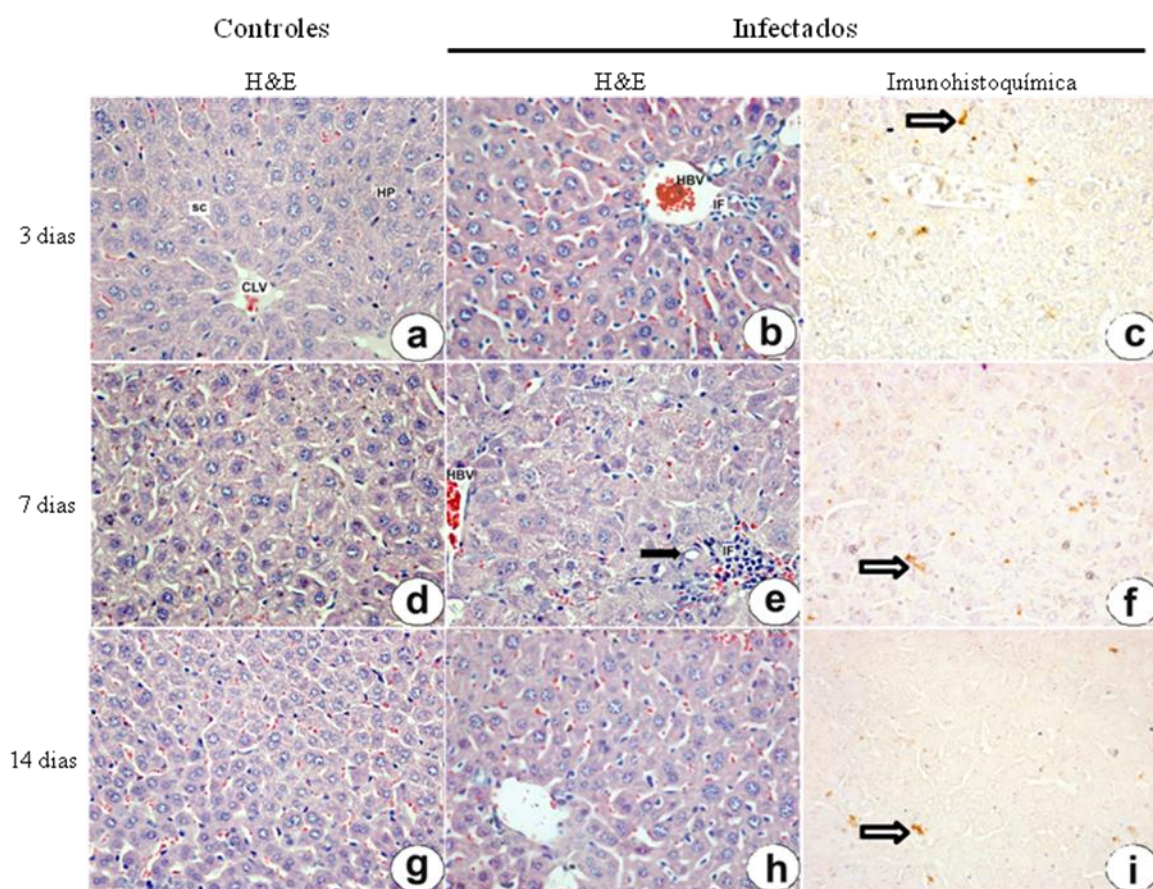


Figura 10: Histopatologia e imunohistoquímica de parênquima hepático de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. Aumento de células inflamatórias (IF), presença de vasos hiperêmicos (HBV) e esteatose microvesicular (seta) foram observados no parênquima hepático de animais infectados nos dias 3 e 7 pi (b, e). Nota-se ausência de alterações histológicas no parênquima hepático de animais controles (a, d, g) e de animais infectados do dia 14 (h). As células que foram marcadas positivamente para o antígeno do CARV foram observadas nos dias 3, 7 e 14 pi (setas brancas em c, f, e i). CLV = veia centro lobular; SC = capilar sinusóide; HP = parênquima hepático. Coloração: Hematoxilina & Eosina. Aumento: 440x.

A quantificação das células inflamatórias foi realizada no parênquima hepático de todos os animais, nos diferentes dias. Como pode ser visto na Figura 11, houve um aumento significativo no número de células inflamatórias no parênquima hepático dos animais infectados nos dias 3 e 7, em relação seus controles, sendo que o pico de células inflamatórias aconteceu no 7º dia pi, confirmando as alterações encontradas na histopatologia.

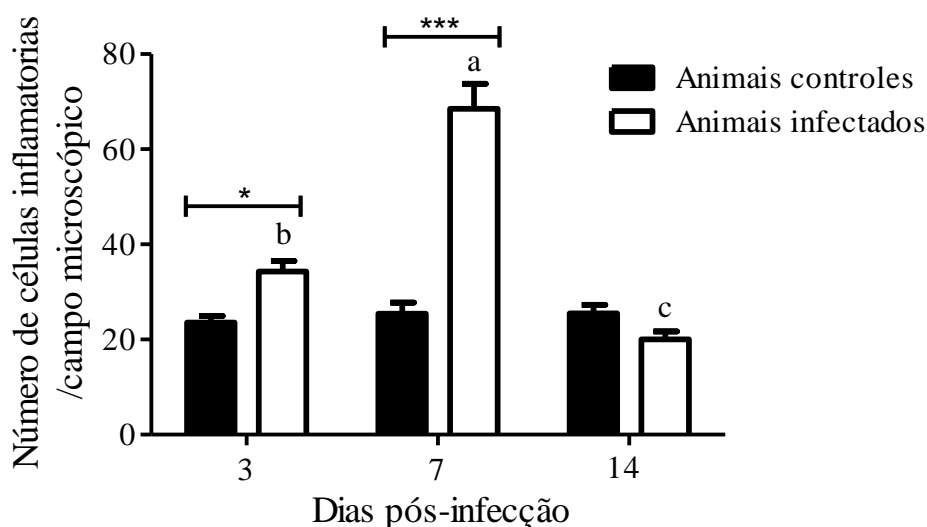


Figura 11: Morfometria de células inflamatórias em cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. A contagem de células inflamatórias foi feita num total de 20 lâminas de fígado, por animal, sendo calculadas as médias e desvios-padrão, onde *** $p < 0,0005$ e * $p < 0,05$ (teste t-Student). Letras a, b, c representam diferenças entre os grupos dos animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.4 - Expressão gênica do Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α)

Sabe-se que a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α está relacionada com estímulos provenientes de bactérias, vírus e protozoários. TNF- α é uma adipocitocina envolvida no processo de inflamação sistêmica, pertencente a um grupo de citocinas que estimulam reações de fase aguda, resultando, dentre outros efeitos, em apoptose, proliferação e diferenciação celular, inflamação e combate a infecções e tumores.

Para verificar se a infecção pelo CARV poderia estimular a produção de TNF- α , a expressão gênica dessa citocina foi avaliada pelo PCR em tempo real (Figura 12). No fígado dos animais infectados, 3 dias pi, houve um aumento significativo na expressão do mRNA de TNF- α , um aumento de 4,5 vezes em relação ao grupo controle. Apesar de não haver diferença estatística significativa, observou-se um aumento na expressão desse gene cerca de 2 vezes no fígado dos camundongos infectados dos grupos 7 e 14 dias, quando comparados aos controles. Assim, níveis elevados de TNF- α no fígado dos animais após a infecção pelo CARV podem estar associados à inflamação observada nesse tecido.

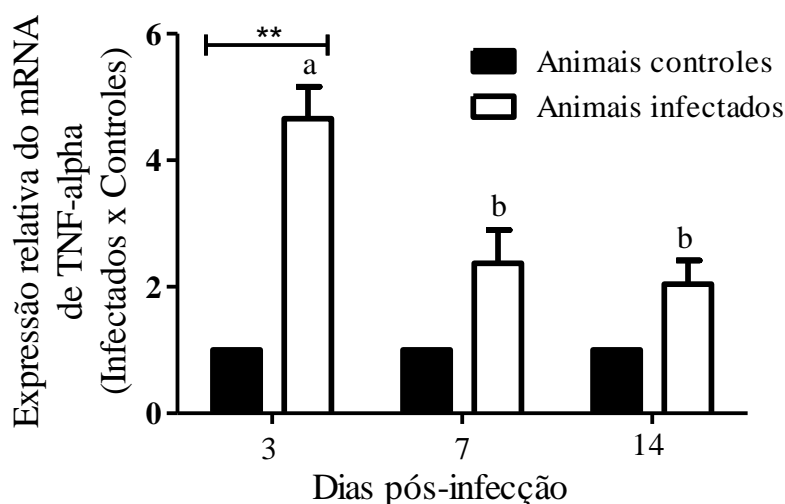


Figura 12: Expressão relativa do mRNA de TNF- α em fígado de camundongos BALB/c infectados com o vírus *Caraparu*. A expressão do mRNA de TNF- α foi avaliada por PCR em tempo real e normalizada pelo GAPDH. Dados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo). ** Indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle onde $p < 0,005$. As letras a e b indicam diferenças entre os grupos de animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.5 - Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo

Para avaliar se o estresse oxidativo estaria envolvido na patogênese hepática desencadeada pelo CARV, as concentrações de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) e de Proteína Carbonilada foram mensuradas, uma vez que, funcionam como marcadores indiretos de danos oxidativos a lipídeos e proteínas, respectivamente. Como mostra a Tabela V, não houve alteração significativa nos níveis de TBARS e Proteína Carbonilada no fígado dos animais infectados pelo CARV.

Tabela V. Biomarcadores de estresse oxidativo em camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*

Variáveis	Grupos Experimentais					
	Dia 3		Dia 7		Dia 14	
	Controle	Infetado	Controle	Infetado	Controle	Infetado
TBARS (nmol/mg protein)	1.03 \pm 0.41	1.02 \pm 0.15	1.49 \pm 0.27	1.49 \pm 0.35	1.76 \pm 0.49	1.66 \pm 0.29
Proteína Carbonilada (nmol/mg protein)	3.98 \pm 0.55	3.27 \pm 0.94	3.57 \pm 0.70	3.79 \pm 1.68	3.54 \pm 1.13	3.59 \pm 0.93

TBARS, Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico. Valores são expressos como média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos de animais infectados e controles.

5.6 - Glutationa Total

Uma vez que, pelas técnicas analisadas, o estresse oxidativo parece não estar envolvido na patogênese hepática desencadeada pelo CARV em camundongos BALB/c e, ainda, sabendo-se que Glutationa é a uma das principais substâncias envolvidas no controle do estado redox intracelular, nossa próxima abordagem foi verificar se o conteúdo de Glutationa total poderia estar alterado no fígado dos animais infectados por este vírus. Como mostra a Figura 13, houve um aumento de 20, 15 e 40% no conteúdo de Glutationa total no fígado dos animais infectados nos dias 3, 7 e 14 pi, respectivamente.

Assim, podemos inferir que durante a infecção pelo CARV, a Glutationa pode estar envolvida na neutralização das EROs, constituindo assim um importante sistema celular que neutraliza tais espécies, desempenhando um papel significativo na manutenção do estado redox celular.

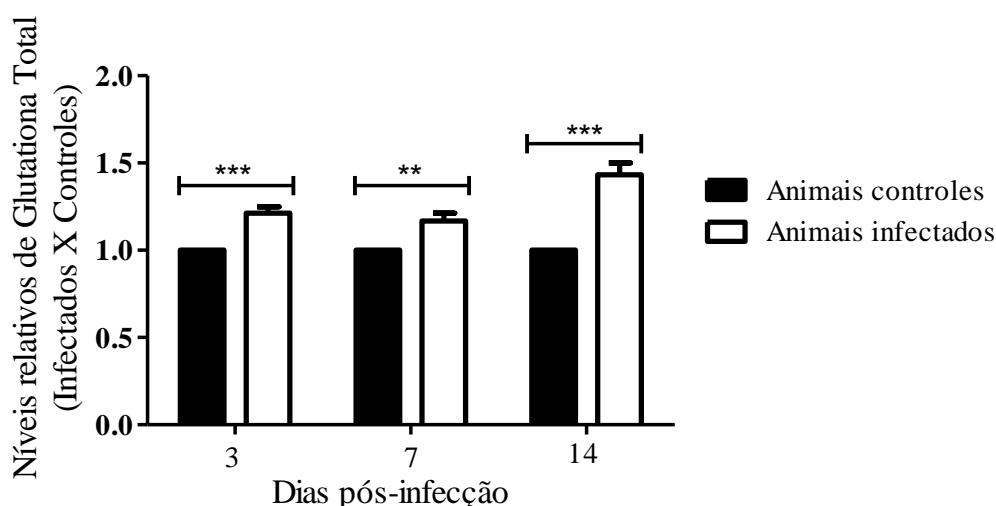


Figura 13: Níveis de glutaciona total em fígado de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus Caraparu. Dados são expressos em quantidades relativas e expressos como a média \pm desvio padrão (n = 8 por grupo), onde $**p < 0,005$ e $***p < 0,0005$ (teste t-Student).

5.7 - Expressão do mRNA das isoformas SOD1, SOD2 e SOD3

Alterações nos níveis da enzima Superóxido Dismutase têm sido associadas com muitas doenças virais, uma vez que esta enzima funciona como um importante mecanismo de defesa contra as EROs produzidas. Portanto, alterações na expressão e/ou atividade dessa enzima podem estar ligadas a patogênese desencadeada pelos vírus. Assim, para verificar se a

infecção pelo CARV altera os níveis de SOD, primeiramente, a expressão de mRNA das três isoformas da SOD (SOD1, SOD2 e SOD3) foi avaliada por PCR em tempo real.

Como mostra a Figura 14(a), houve uma significativa redução na expressão do mRNA da SOD1 no fígado dos animais infectados nos dias 3 e 7 pi, sendo essa redução de aproximadamente 50% e 32%, respectivamente. No 14º dia pi a expressão relativa de SOD1 no fígado dos animais infectados apresentou-se próxima aos níveis dos animais controles do mesmo dia.

Em relação à expressão relativa do mRNA das enzimas SOD2 e SOD3, houve um aumento na expressão gênica dessas enzimas no fígado dos animais infectados no 14º dia pi (Figura 14b, c). Esse aumento foi de aproximadamente 100% para SOD2 e 200% para SOD3. Nos demais dias não houve diferença estatística significativa na expressão de SOD2 e SOD3 entre grupos controles e infectados.

5.8 - Expressão protéica de SOD1

Uma vez alterada a expressão do mRNA da três isoformas de SOD e desde que SOD1 é a isoforma citoplasmática mais abundante, portanto, provavelmente a mais importante no contexto da neutralização de EROs dentro da célula, nosso próximo passo foi investigar se a expressão protéica dessa enzima também estaria alterada após infecção pelo CARV. Foram feitos ensaios de Western blot com extratos protéicos totais para SOD1 e beta actina, que foi usada como controle interno da expressão de proteínas celulares. O painel radiográfico da revelação do Western Blot mostrou que, assim como na expressão relativa do mRNA, a expressão protéica da SOD1 também apresentou-se diminuída no fígado dos animais infectados nos dias 3 e 7 pi (Figura 15a, b). Uma expressão protéica similar de SOD1 foi observada entre os animais controles e infectados do 14º dia (Figura 15c). Para corroborar com as bandas analisadas pelas radiografias, a densitometria foi realizada (Figura 15c, d). Os gráficos mostram os valores obtidos para a intensidade das bandas dos animais infectados em relação aos controles, sendo que, para SOD1, houve uma diminuição de cerca de 20% e 15% na intensidade das bandas nos animais infectados dos dias 3 e 7 pi, respectivamente. A intensidade das bandas de SOD1 obtida para os animais infectados do dia 14 foi praticamente igual a do grupo controle (Figura 15d), assim como a intensidade das bandas obtida para beta actina foi similar entre todos os grupos (Figura 15e).

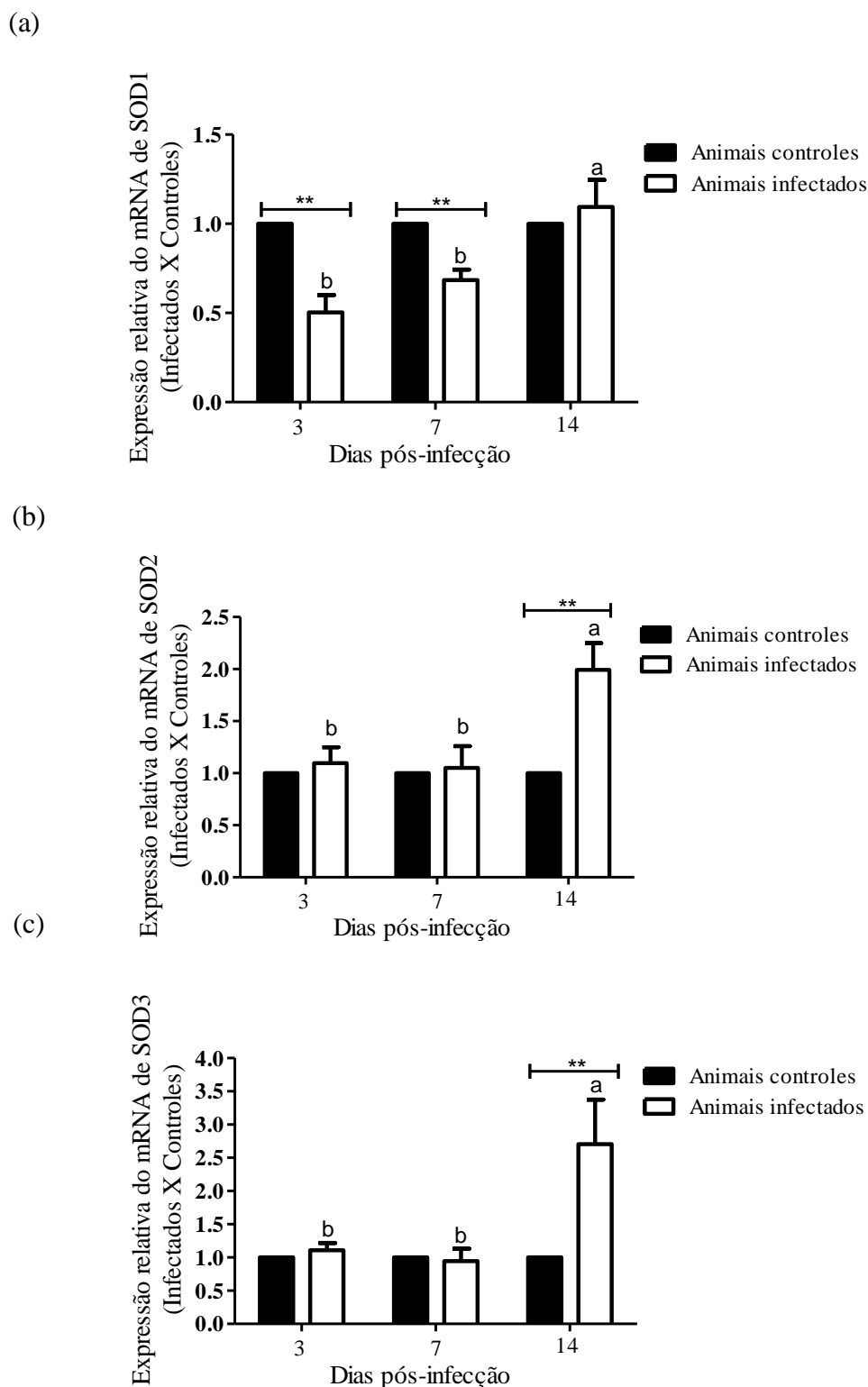


Figura 14: Expressão relativa do mRNA de SOD1, SOD2 e SOD3 em fígado de camundongos BALB/c infectados com o vírus *Carapar*. A expressão do mRNA de SOD1, 2 e 3 foi avaliada por PCR em tempo real e normalizada pelo GAPDH. Dados são expressos como a média \pm desvio padrão (n = 8 por grupo). ** Indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle onde $p < 0,005$. As letras a e b indicam diferenças entre os grupos de animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

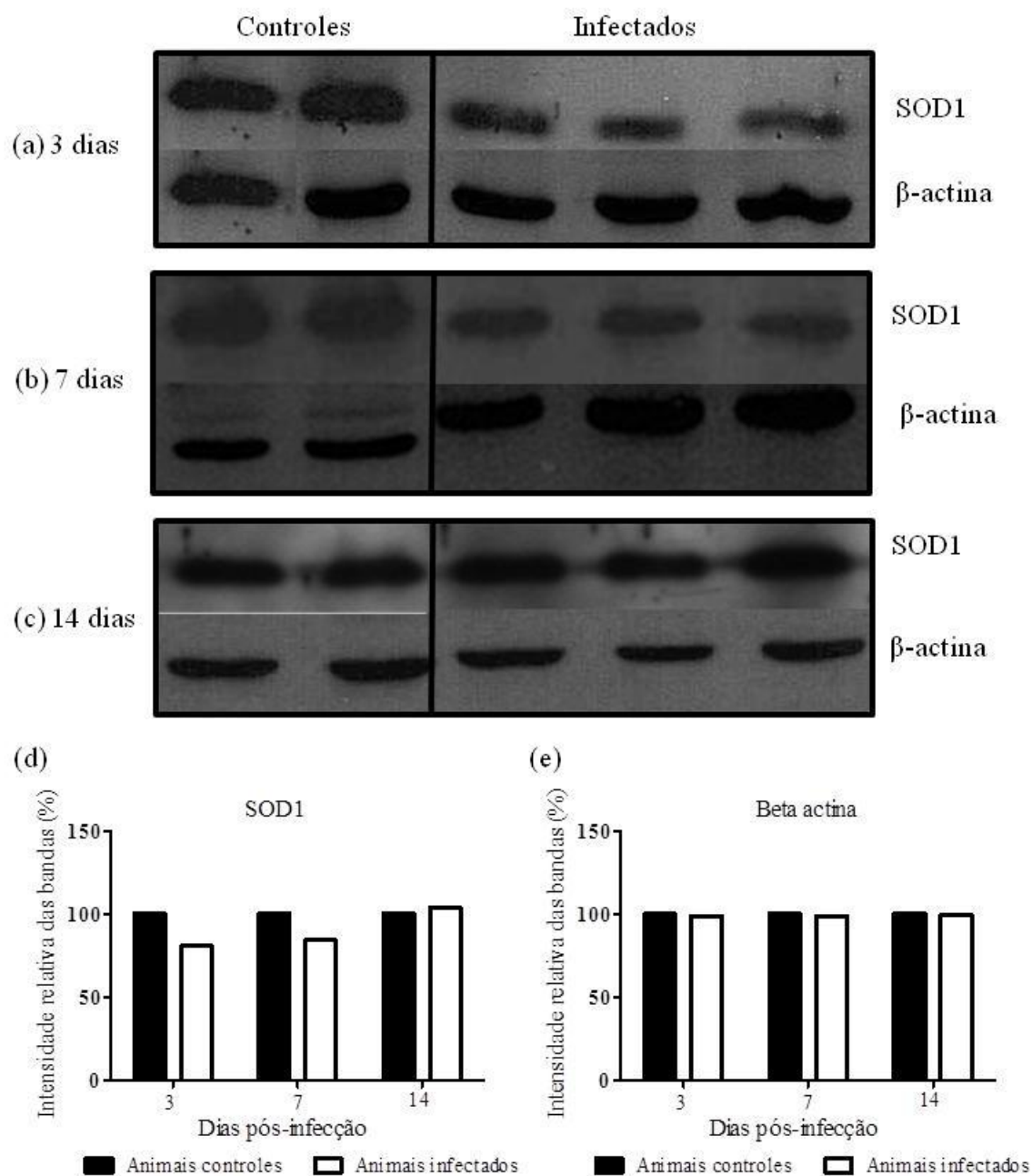


Figura 15: Expressão das proteínas SOD1 e Beta actina em fígado de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. Extratos proteicos totais de fígado de animais infectados ou não com o CARV, em diferentes dias, foram submetidos ao ensaio de Western blot, utilizando-se anticorpo anti-SOD1 ou anti-beta actina. (a) painel radiográfico obtido dos animais controles e infectados sacrificados após 3 dias; (b) painel radiográfico obtido dos animais controles e infectados sacrificados após 7 dias; (c) painel radiográfico obtido dos animais controles e infectados sacrificados após 14 dias; (d) densitometria das bandas obtidas para SOD1; (e) densitometria das bandas obtidas para Beta actina. As figuras de Western blot são representativas de 3 experimentos. A densitometria das bandas foi feita com o auxílio do Programa System Alpha Innotech by Alpha View Analyse software V.3.0.0.0.

5.9 - Atividade total da SOD

Uma vez que a infecção pelo CARV alterou a expressão gênica e protéica da enzima SOD no fígado de camundongos, nosso próximo passo foi avaliar se a atividade dessa enzima estaria também alterada. Como pode ser visto na Figura 16, a atividade total da SOD apresentou uma diminuição cerca de 70% no fígado dos animais infectados no 3º dia pi. Ainda, no fígado dos animais infectados do 7º dia não houve alteração significativa na atividade total dessa enzima. No fígado dos animais infectados do 14º dia houve um aumento de cerca de 30%. Portanto, as alterações encontradas na atividade de SOD corroboraram com as alterações observadas em sua expressão gênica e protéica.

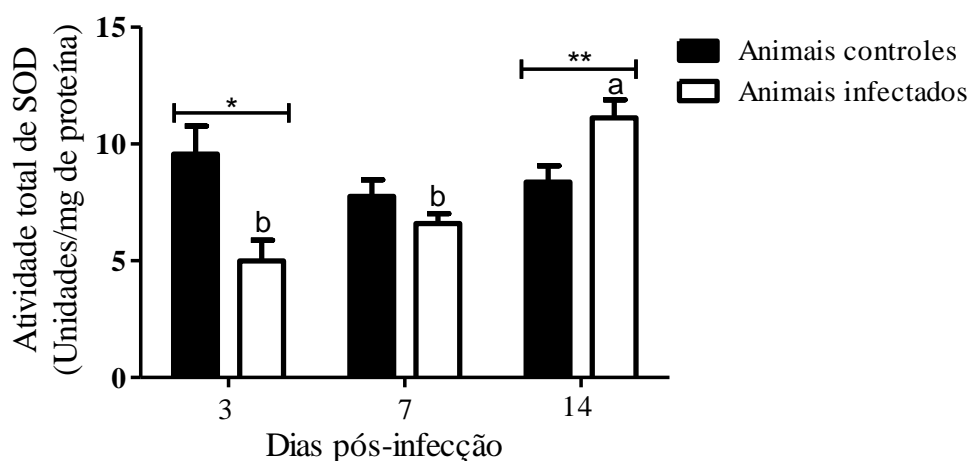


Figura 16: Atividade total da enzima antioxidante Superóxido Dismutase em fígado de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. A atividade total de SOD foi avaliada por teste bioquímico específico. Dados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde $*p < 0,05$ e $**p < 0,005$ (teste t-Student). Letras a e b indicam diferenças entre os grupos de animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.10 - Expressão do mRNA da Catalase

Outra enzima importante do sistema de defesa antioxidante é a Catalase, que reduz o H_2O_2 à H_2O , contribuindo assim para manter o equilíbrio redox no ambiente celular. Assim, analisamos se a infecção pelo CARV também poderia alterar a expressão gênica e protéica dessa enzima, bem como sua atividade. Em relação à expressão relativa do mRNA da Catalase, a infecção pelo CARV causou uma diminuição na expressão gênica dessa enzima 3 dias pi. Ainda, no 7º dia, os níveis do mRNA de Catalase foram semelhantes no fígado dos

animais infectados e controles; porém, um aumento significativo foi observado no fígado dos animais infectados no 14º dia pi (Figura 17).

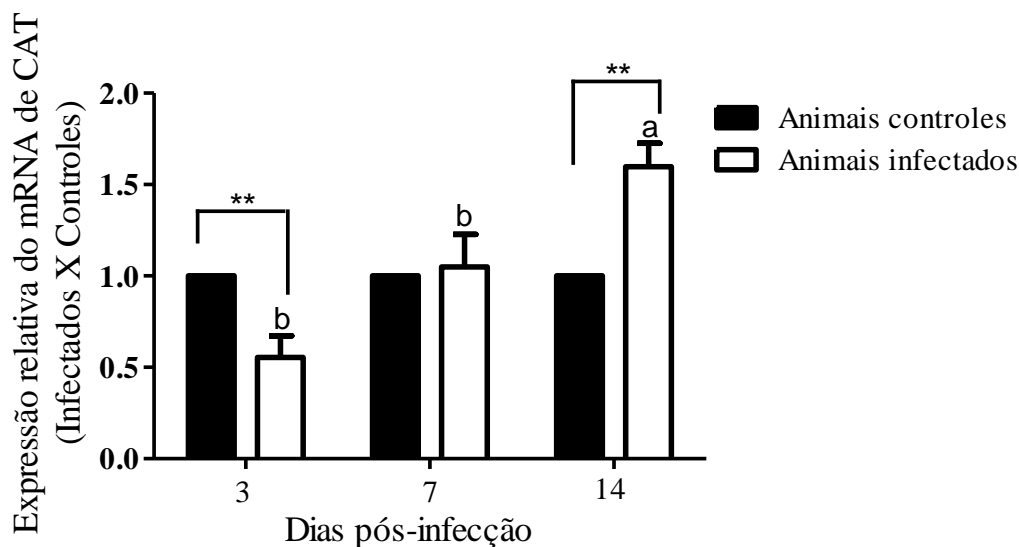


Figura 17: Expressão relativa do mRNA de Catalase em fígado de camundongos BALB/c infectados com o vírus Caraparu. A expressão do mRNA de Catalase foi avaliada por PCR em tempo real e normalizada pelo GAPDH. Dados são expressos como a média \pm desvio padrão (n = 8 por grupo). ** Indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle onde $p < 0,005$. As letras a e b indicam diferenças entre os grupos de animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.11 - Expressão protéica da Catalase

Para analisar se a infecção pelo CARV poderia alterar também a expressão protéica da enzima Catalase, foi feito ensaio de Western blot com extratos protéicos totais das amostras de fígado e anticorpo específico. Como pode se observar na Figura 18, o painel com as radiografias da revelação do Western Blot não mostrou alteração evidente na expressão de Catalase, exceto no 14º dia, quando parece que houve um ligeiro aumento em sua expressão no fígado dos animais infectados (Figura 18c). A densitometria das bandas de Catalase (Figura 18d) foi realizada e apontou uma discreta diminuição na expressão protéica dessa enzima no fígado dos animais infectados dos dia 3 e 7, cerca de 10% e 6%, respectivamente. Por outro lado, um aumento cerca de 20% foi observado no fígado dos animais infectados 14 dias pi (Figura 18d). As análises densitométricas das bandas obtidas para a Beta actina não mostraram diferença entre os grupos controles e infectados (Figura 18e).

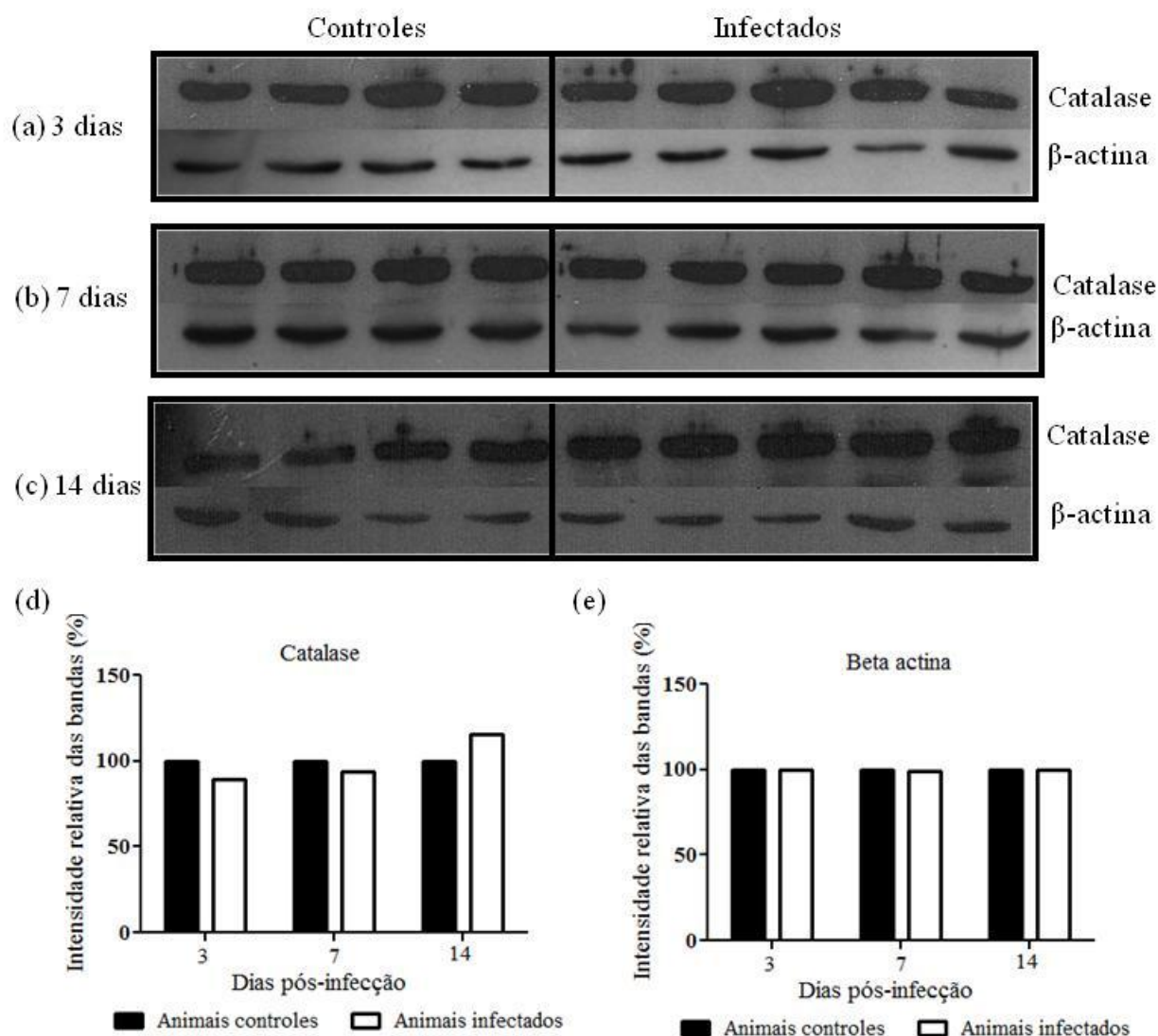


Figura 18: Expressão das proteínas Catalase e Beta actina em fígado de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus *Caraparu*. Extratos proteicos totais de fígado de animais infectados ou não com o CARV, em diferentes dias, foram submetidos ao ensaio de Western blot, utilizando-se anticorpo anti-Catalase ou anti-beta actina. (a) painel radiográfico obtido dos animais controles e infectados sacrificados após 3 dias; (b) painel radiográfico obtido dos animais controles e infectados sacrificados após 7 dias; (c) painel radiográfico obtido dos animais controles e infectados sacrificados após 14 dias; (d) densitometria das bandas obtidas para Catalase; (e) densitometria das bandas obtidas para Beta actina. As figuras de Western blot são representativas de 3 experimentos. A densitometria das bandas foi feita com o auxílio do Programa System Alpha Innotech by Alpha View Analise software V.3.0.0.0.

5.12 - Atividade total da Catalase

A próxima etapa foi então avaliar se a infecção pelo CARV poderia também alterar a atividade da enzima Catalase. Ao contrário da expressão do mRNA da Catalase que mostrou-se diminuída no fígado dos animais infectados 3 dias pi, a atividade da enzima, nesse mesmo dia e grupo, mostrou-se aumentada. No entanto, no 7º dia, a atividade da enzima mostrou-se diminuída no fígado dos animais infectados e no 14º dia, a atividade de Catalase foi estatisticamente igual entre o grupo de animais infectados e controles (Figura 19).

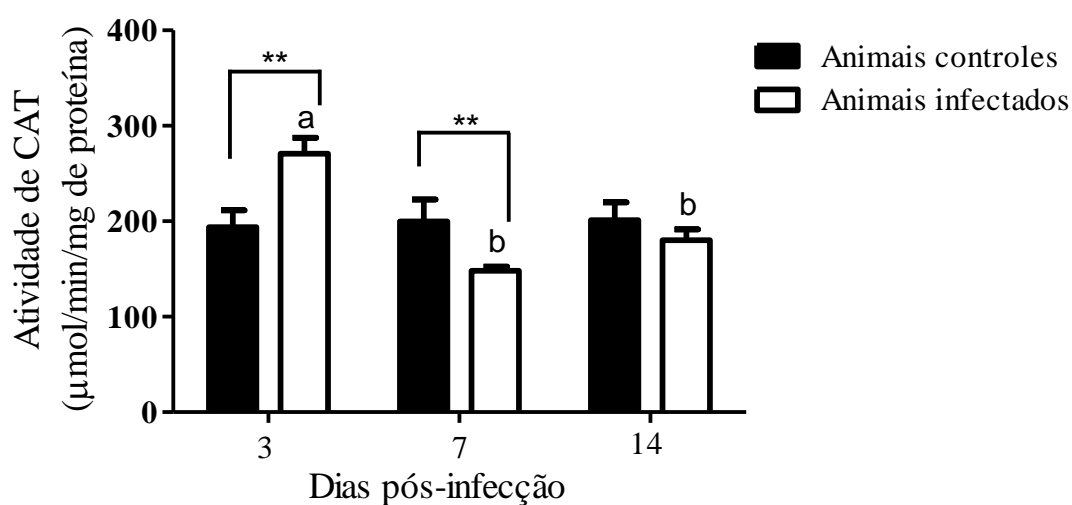


Figura 19: Atividade total da enzima antioxidante Catalase em fígado de camundongos BALB/c infectados ou não com o vírus Caraparú. A atividade total de CAT foi avaliada por teste bioquímico específico. Dados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde $**p < 0,005$ (teste t-Student). Letras a e b indicam diferenças entre os grupos de animais infectados (Teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os vírus do Grupo C foram uns dos primeiros arbovírus descritos na região Amazônica brasileira durante a década de 1950. Tais vírus apresentam distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais das Américas e estão associados a doenças humanas (Shope *et al.*, 1988; Nunes *et al.*, 2005; Forshey *et al.*, 2010). O CARV, integrante desse sorogrupo, já foi isolado diversas vezes na região norte do Brasil e também em um caso isolado de um paciente na região sudeste (Vale do Ribeira, São Paulo). Em camundongos (B6C3F1) neonatos infectados via intraperitoneal, o CARV causa hepatite e encefalite (Brinton *et al.*, 1992). Já em seres humanos, o CARV causa uma infecção sistêmica com características clínicas de febre, mialgia, calafrios e mal-estar (Iversson *et al.*, 1987; Shope *et al.*, 1988). Apesar de sua importância, muitas de suas características epidemiológicas e patogênicas permanecem incertas.

Neste estudo, camundongos BALB/c adultos jovens foram inoculados com o CARV via subcutânea, simulando a rota natural de infecção, com dose de 10^5 UFP. Os resultados mostraram que, nesta dose e via utilizadas, os animais desenvolveram hepatite aguda e sinais de doença sistêmica, caracterizada por piloereção, prostração e perda de peso. No entanto, a doença apresentou evolução benigna, já que os animais infectados recuperaram e nenhum veio a óbito. Através da análise da histopatologia do fígado e dos níveis séricos das transaminases hepáticas ALT e AST, foi demonstrado que os camundongos infectados desenvolveram hepatite. Os danos hepáticos encontrados pela análise histopatológica foram mais significativos nos 3º e 7º dias pi, dentre eles inflamação moderada e multifocal, desorganização da arquitetura dos hepatócitos, hiperemia e esteatose microvesicular. Já as transaminases hepáticas ALT e AST encontraram-se aumentadas no soro dos animais infectados dos dias 3 e 7. Brinton e colaboradores (1992) também encontraram elevação das enzimas hepáticas no terceiro dia após a infecção pelo CARV em camundongos neonatos, corroborando com nossos resultados.

A imunohistoquímica detectou o antígeno do CARV no citoplasma dos hepatócitos de todos os animais infectados, nos diferentes dias e em várias áreas do parênquima hepático. A imunocoloração aos antígenos do CARV foi mais intensa no fígado dos animais infectados do 3º dia, quando o título viral foi de 10^6 UFP/g de tecido, indicando que o fígado é um sítio de replicação ativa do CARV. O vírus não foi recuperado por titulação no 7º dia pi, apesar da

inflamação e do dano hepático acentuados observados nesse dia. Esse achado pode ser explicado devido a intensa resposta inflamatória observada no dia 7 pi, o que pode ter inibido ou contido a replicação viral. Nos animais infectados 14 dias pi, nenhuma alteração histopatológica foi encontrada no parênquima hepático e também o vírus não foi recuperado deste órgão por titulação; entretanto, uma imunomarcação positiva aos antígenos do CARV foi encontrada, mostrando que, a presença dos antígenos virais pode permanecer mesmo após a recuperação do fígado.

Embora ainda não haja relatos sobre hepatite desencadeada pelo CARV em seres humanos, acredita-se, através dos resultados deste e de outros estudos, que o fígado possa ser um local para a replicação viral. Pacientes infectados pelo CARV normalmente recuperam após 2-5 dias, sem apresentar nenhuma sequela ou mortalidade; entretanto, exames de posteriores a doença ou de biomarcadores de danos hepáticos, como ALT e AST, não são feitos. Para outro importante bunyavírus no Brasil, o OROV, não existe nenhum relato de hepatite em humanos, no entanto, níveis alterados de ALT e AST já foram reportados em pacientes infectados, sugerindo assim que o fígado possa ser um órgão alvo da infecção humana por este vírus (Pinheiro *et al.*, 1981). Os resultados de histopatologia, imunohistoquímica e titulação de vírus mostrados aqui sugerem que a infecção do fígado pelo CARV provavelmente ocorre numa etapa inicial pós-infecção e a replicação do vírus é eficiente nesse órgão. Assim, experimentalmente, a infecção subcutânea de camundongos BALB/c pelo CARV pode ser usada como um modelo de hepatite induzida por este vírus.

Diversos estudos sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese de várias infecções virais (Narayanan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Até agora existem poucos estudos sobre o estresse oxidativo na patogênese dos bunyavírus. Assim, o modelo de hepatite após infecção pelo CARV estabelecido neste trabalho poderia ser útil para avaliar o papel do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes nessa patologia e, desse modo, ampliar o conhecimento sobre as características patogênicas deste vírus.

Portanto, para avaliar se a infecção pelo CARV seria capaz de causar estresse oxidativo no fígado de camundongos, os níveis dos biomarcadores indiretos desse evento, TBARS e Proteína carbonilada, foram mensurados. Tais biomarcadores se apresentam elevados quando há um aumento intracelular de EROs, indicando peroxidação lipídica e oxidação protéica, respectivamente. Nossos resultados mostraram que não houve alterações destes biomarcadores nos diferentes grupos e dias analisados, indicando que a infecção do fígado

pelo CARV não necessariamente acarreta dano oxidativo. Contudo, outra hipótese levantada foi a de que algum(ns) antioxidante(s) poderia(m) ter neutralizado as EROs a tempo de não originar o estresse oxidativo. Para checar essa hipótese, avaliamos alguns dos principais antioxidantes celulares, incluindo a Glutathione e as enzimas SOD e Catalase.

Primeiramente analisamos os níveis da Glutathione, que é o principal antioxidante endógeno produzido pelas células. Houve um aumento no conteúdo de Glutathione Total no fígado de todos os animais infectados, nos diferentes dias. Assim, esse resultado indica que, na infecção hepática pelo CARV, como não houve alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo, a Glutathione endógena pode estar envolvida na neutralização das EROs e constitui um importante sistema celular que neutraliza a oxidação e desempenha um papel importante na manutenção de um ambiente redox intracelular.

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da Glutathione no contexto das infecções virais. Uma vez que a Glutathione se apresenta como essencial para a função hepática adequada, a sua forma exógena tem sido utilizada para inibir o estresse oxidativo. Tian e colaboradores (2010) demonstraram que a infecção pelo DENV2 diminuiu significativamente os níveis de Glutathione endógena em células HepG2 e, após o tratamento suplementar com a forma exógena, a produção de novas partículas virais diminuiu consideravelmente. Similarmente, em outras infecções virais, tais como a infecção pelo vírus da Gripe A e Herpes simples tipo 1 (HSV-1), o tratamento com Glutathione exógena também diminuiu a produção de partículas virais; no caso das infecções pelo rinovírus, tal tratamento suprimiu a produção de radicais superóxido em camundongos (Cai *et al.*, 2003; Palamar *et al.*, 1996; Palamar *et al.*, 1995; Pap *et al.*, 2008). Recentemente, Wang e colaboradores (2013) mostraram também que a administração de Glutathione exógena pode prevenir o estresse oxidativo e a injúria hepática em modelo animal experimental de DENV2, chamando atenção para seu uso promissor no tratamento das infecções por esse vírus. Esses estudos, em colaboração com nossos resultados, mostram que, antioxidantes, como a Glutathione, apresentam grande potencial terapêutico para as doenças virais cujo estresse oxidativo está envolvido na patogênese.

A primeira ERO produzida na via de redução do oxigênio é o radical superóxido, o qual é metabolizado a H_2O_2 pela enzima Superóxido Dismutase, o que a torna uma das mais importantes enzimas antioxidantes. Alterações nos níveis de SOD têm sido relacionadas a complicações de algumas doenças virais, como as causadas pelo HCV, vírus influenza, HIV,

DENV, dentre outras. Então, nossa próxima abordagem foi investigar se essa enzima poderia estar alterada após a infecção hepática pelo CARV. De acordo com as expressões do mRNA e da proteína, houve uma diminuição da SOD1 (isoforma citoplasmática) no fígado dos animais infectados no 3º e 7º dias pi. Por outro lado, um aumento do mRNA de SOD2 (isoforma mitocondrial) e SOD3 (isoforma extracelular) ocorreu no fígado dos animais infectados do 14º dia. Com relação a atividade dessa enzima, houve uma diminuição e aumento da sua atividade no fígado dos animais infectados dos dias 3 e 14, respectivamente.

Esses resultados sugerem que uma baixa expressão gênica/protéica de SOD1 e uma baixa atividade total de SOD, observadas no 3º dia pi pelo CARV, podem estar relacionados à ativa multiplicação do vírus nesse órgão nesse dia, já que o CARV foi recuperado do fígado com título de 10^6 UFP/mg de tecido. Sabe-se que, ao multiplicar na célula hospedeira, o vírus é capaz de reverter toda maquinaria de síntese celular a seu favor, alterando importantes componentes celulares. Assim, uma diminuição na expressão/atividade de SOD pode ser resultado dessa ativa multiplicação viral. Por outro lado, com a evolução da doença, quando os animais já não apresentaram alterações no fígado e nem sinais de doença (14 dias pi), a expressão do mRNA de SOD2 e SOD3 e a atividade total da SOD aumentaram, provavelmente como mecanismo desenvolvido afim de reverter os possíveis efeitos deletérios resultantes da sua baixa abundância nos dias iniciais da infecção.

Hosakote e colaboradores (2009) demonstraram que a infecção pelo vírus Respiratório Sincicial (RSV) também foi capaz de diminuir a expressão gênica e protéica das enzimas SOD1, SOD3 e Catalase, em células epiteliais das vias respiratórias. Ainda, Hosakote e colaboradores (2011) mostraram que a infecção pelo RSV induz uma redução na expressão e atividade de SOD1 e SOD2 em pulmões de camundongos e nas vias aéreas de crianças com bronquiolite severa, e que o tratamento com antioxidantes melhora a progressão da doença. Narayanan e colaboradores (2011) mostraram que a infecção de células epiteliais de pulmão humano pelo vírus da Febre do Vale Rift (RVFV), um phlebovírus da família *Bunyaviridae*, provoca uma diminuição da SOD1 e conseqüente estresse oxidativo. Esses dados corroboram com os nossos resultados, os quais mostram que a enzima antioxidante SOD pode estar diminuída em um momento inicial após a infecção viral.

Adicionalmente, estudos demonstram que um aumento de TNF- α está relacionado com a diminuição de SOD1 (Afonso *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2011). Através da análise da expressão relativa de mRNA do TNF- α , observamos que, em concordância com trabalhos da

literatura, a diminuição de SOD1 no fígado dos animais infectados com o CARV foi concomitante ao aumento dos níveis de TNF- α , no 3º dia pi. Assim, no fígado dos animais infectados no 3º dia pi, a ativa replicação viral, juntamente com o quadro de inflamação aguda e presença de citocinas pró-inflamatórias podem ter contribuído para diminuição da enzima antioxidante SOD. Entretanto, mesmo com a diminuição da SOD nesse período, não foram observadas alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo utilizados, reforçando a ideia de que a Glutathione pode ter um papel primordial em conter a oxidação dos componentes celulares e prevenir alterações no balanço redox.

Outra enzima que participa na regulação redox celular é a Catalase, uma hemoproteína encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado que catalisa a redução do H₂O₂ a H₂O e O₂ (Scott *et al.*, 1991). Assim como GPx, Catalase também é de grande importância, pois, elimina o excesso de peróxido de hidrogênio evitando que o H₂O₂, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, produzam o radical hidroxil que é altamente reativo e tóxico.

Nossos resultados mostraram que houve uma redução na expressão relativa do mRNA da Catalase no fígado dos animais infectados pelo CARV 3 dias pi e um aumento 14 dias pi. Ainda, no fígado dos animais infectados, a expressão da proteína Catalase apresentou uma discreta diminuição nos dias 3 e 7 pi e um discreto aumento no dia 14 pi. Já a atividade total dessa enzima no fígado dos animais infectados aumentou no 3º dia pi e diminuiu no 7º dia pi. O aumento observado na atividade total da Catalase 3 dias pi, em contraste à redução apresentada na expressão gênica e protéica nesse mesmo dia, pode ter ocorrido devido a um retardo/demora na resposta da atividade dessa enzima, uma vez que uma redução na sua atividade foi observada no 7º dia pi.

Yashoda e colaboradores (2011) mostraram que a infecção pelo RSV reduziu a expressão e atividade da Catalase em pulmões de camundongos e nas vias aéreas de crianças com bronquiolite severa, colaborando para o estresse oxidativo observado no estudo. Yahya e colaboradores (2013) demonstraram que pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), com hepatocarcinoma hepático, apresentaram níveis séricos de Catalase mais baixos que seus controles e um aumento das espécies reativas. Entretanto, Duygu e colaboradores (2012) encontraram níveis elevados de Catalase em pacientes com hepatite B crônica e aumento no estresse oxidativo.

Como mencionado anteriormente, a replicação viral associada à inflamação aguda e presença de citocinas pró-inflamatórias no fígado dos animais infectados pelo CARV podem

também ter contribuído para a redução da enzima Catalase, assim como da SOD, nos tempos iniciais pós-infecção. No entanto, essa diminuição de Catalase também não foi suficiente para provocar um estresse oxidativo evidente.

A nossa avaliação do efeito da infecção de camundongos BALB/c pelo CARV nos dias 3, 7 e 14 após a infecção foi uma tentativa de representar todos os eventos encontrados durante a progressão da doença, desde a hepatite aguda (dias 3 e 7) até a recuperação dos animais (dia 14). Entretanto, a análise em tempos anteriores ao de 3 dias poderia contribuir para uma melhor compreensão das relações entre a Glutathione endógena, EROs, antioxidantes e mediadores anti-inflamatórios na doença hepática induzida por este vírus.

De acordo com os resultados mostrados aqui, uma figura esquemática com os possíveis fatores que contribuíram para o desenvolvimento de hepatite aguda e consequente melhora dos camundongos, no nosso modelo de infecção pelo CARV, é apresentada abaixo (Figura 20). Resumidamente, após a infecção subcutânea de camundongos BALB/c com 10^5 UFP do CARV, o vírus apresenta hepatotropismo. Inicialmente pós-infecção do fígado, o vírus multiplica-se ativamente, resultando em um aumento nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α , que culmina com ativação da resposta inflamatória e provável inibição de SOD1. Assim, um quadro de hepatite aguda é estabelecido, com aumento de células inflamatórias e níveis séricos de AST/ALT. Ainda, observa-se um aumento nos níveis endógenos de Glutathione total e, de maneira geral, uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD/CAT. Contudo, nenhum estresse oxidativo é evidenciado. Com o passar dos dias, provavelmente após o 8º e 9º dias, uma efetiva resposta do hospedeiro à infecção é estabelecida. Desde que os animais recuperam da doença, não há mais alteração histopatológica no fígado, o vírus não é mais detectado pela técnica de titulação e os níveis de TNF- α , células inflamatórias e de AST/ALT voltam ao normal. Ainda, há um aumento das enzimas SOD/CAT e de Glutathione total, com manutenção do equilíbrio redox celular e, portanto sem estresse oxidativo evidente.

Dessa forma, este trabalho demonstrou que a infecção pelo CARV resulta em doença hepática com alterações nas defesas antioxidantes, mas sem estresse oxidativo. A modulação do “status” antioxidante pode ter um papel fundamental em conter o estresse oxidativo na infecção hepática causada por este vírus. Este trabalho abre perspectivas sobre o papel do estresse oxidativo/defesas antioxidantes em outras formas de hepatite desencadeada por vírus, sejam as formas mais leves até as mais graves, bem como a capacidade de cada agente desencadear a produção de EROs e a extensão e o tipo de dano oxidativo gerado.

Uma vez que a doença causada pelo CARV é um problema de saúde pública e de potencial caráter emergente, este estudo contribui para o conhecimento dos primeiros mecanismos sobre os aspectos relacionados à sua patogênese. Uma vez compreendidas essas relações, este conhecimento poderá também ser estendido a outros importantes patógenos da família *Bunyaviridae*.

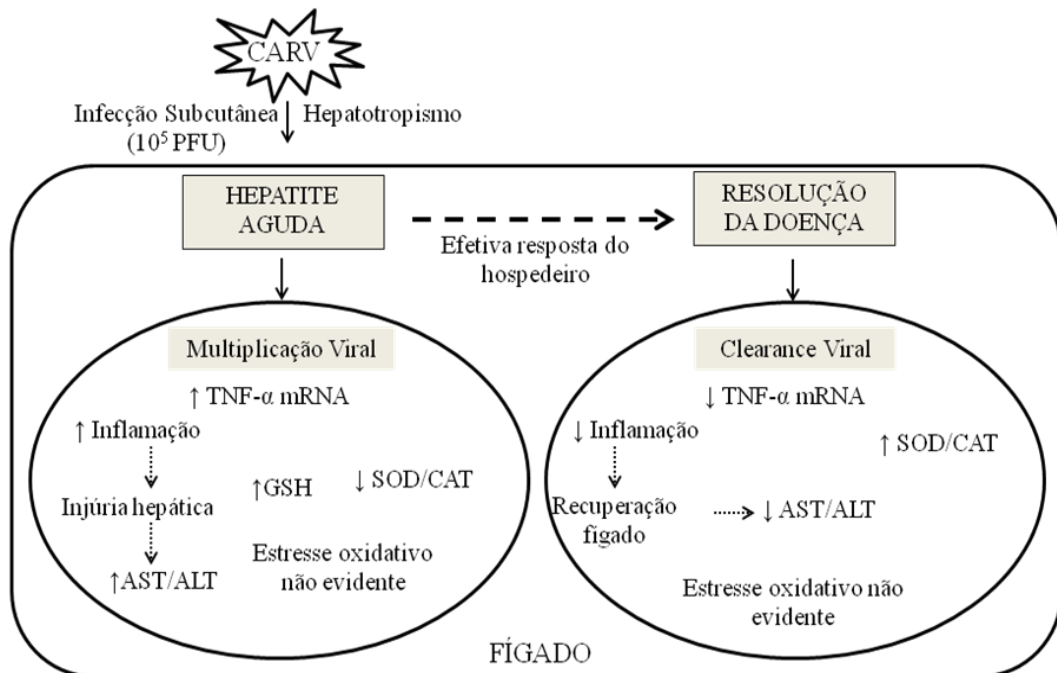


Figura 20: Representação esquemática de possíveis fatores associados à infecção pelo vírus *Caraparú* que contribuem para a hepatite aguda e melhora da doença em camundongos BALB/c.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, S. *et al.* **Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 81, p.391-399. 2009.
- AEBI, H. **Catalase in vitro.** *Methods Enzymol.* 105, 121-6. 1984.
- AFONSO, V. *et al.* **Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human Cu/Zn superoxide dismutase 1 promoter via JNK/AP-1 signaling pathway.** *Free Radic Biol Med* 41:709–721. 2006.
- AGUILAR, P.V. *et al.* **Guaroa virus infection among humans in Bolivia and Peru.** *Am J Trop Med Hyg.* 83(3):714–21; 64. 2010.
- AKAIKE, T. *et al.* **Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 2448-2453. 1996.
- ALTENHOFER, S. **The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease.** *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2327–2343. 2012.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7915–7922. 1993.
- ANDRICOPULO, A. D. *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2283. 2006.
- AQUINO, V.H.; ARRUDA, E.; FIGUEIREDO, L.T.M. **Brazilian Viruses in the Genus Orthobunyavirus.** *Virus Reviews and Research*, v. 7 (2), p. 7-20, 2002.
- ARMOGIDA, M.; NISTICO, R.; MERCURI, N.B. **Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia.** *Brit. J. Pharmacol.* 166, 1211–1224. 2012.
- BEATY, B.J.; TRENT, D.W.; ROEHRIG, J. T. **Virus variation and evolution: Mechanisms and epidemiological significance.** In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology.* Monath, T.P. (ed.). Boca Raton: CRC Press. 1988.
- BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. **Oxidative decay of DNA.** *J. Biol. Chem.* 272. 19633–19636. 1997.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** *Physiol. Rev.* 87, 245–313. 2007.
- BISHOP, D.H. *et al.* **Bunyaviridae.** *Intervirology.* v. 14, p. 125-143. 1980.
- BOULOY, M. **Bunyamwera virus.** In: SM W, editor. *The encyclopedia of arthropodtransmitted infections.* Wallingford, UK: CAB International. p. 94–7. 2001.

- BRINTON, *et al.* **Characterization of murine Caraparu Bunyavirus liver infection and imunomodulator-mediated antiviral protection.** Antiviral Research, v. 20, p. 155-171. 1992.
- BROWN, L.A.S. **Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress.** Am J Physiol; 266: L172±L177. 1994.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods Enzymol. 52, 302-10. 1978.
- CAI, J. *et al.* **Inhibition of influenza infection by glutathione.** Free Radic Biol Med, v. 34, p. 928–936. 2003.
- CALISHER, C.H. **History, classification, and taxonomy of viruses in the family *Bunyaviridae*.** In The Bunyaviridae; Elliot, R., Ed.; Plenum Press: New York, NY, USA, pp. 1–17. 1996.
- CASALS, J.; WHITMAN, L. **Group C. A new serological group of hitherto undescribed arthropod-borne viruses.** Immunological studies. Am J Trop Med Hyg J 0:250-258. 1961.
- CASOLA, A. *et al.* **Oxidant tone regulates RANTES gene transcription in airway epithelial cells infected with Respiratory Syncytial Virus: role in viral-induced Interferon Regulatory Factor activation.** J Biol Chem 276:19715-19722. 2001.
- CASTRO, S.M. *et al.* **Antioxidant treatment ameliorates respiratory syncytial virus-induced disease and lung inflammation.** Am J Respir Crit Care Med 174:1361-1369. 2006.
- CAUSEY, O.R. *et al.* **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.
- CDC. **Syndrome definitions for diseases associated with critical bioterrorism-associated agents. 2003 [cited 2011 December 12]; available from: Disponível em <<http://www.cdc.gov/epo/dphsi/syndromic/framework.htm>>.** Acesso em: 20 out. 2013.
- CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; MUZYKANTOV, V.R. **Antioxidant strategies in respiratory medicine.** Treatmen Respirator Medicine, v. 5, p. 47–78. 2006.
- Ciclo biológico dos arbovírus** (Figura 1). Disponível em: < <http://www.microbeworld.org>>. Acesso em: 20/11/2013.
- COACCIOLI, S. *et al.* **Oxidant/antioxidant status in patients with chronic HIV infection.** Clin Ter 161:55-58. 2010.
- COIMBRA, T. L. M. *et al.* **Arthropod and rodent-borne viruses detected in São Paulo state, Brazil,** p. 168–176. In Travassos da Rosa, A. P. A.; Travassos da Rosa, J. F. S.; Vasconcelos, P. F. C. (ed.), an overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Instituto Evandro Chagas, Belém, Brazil. 1998.

Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Disponível em: <<http://ictvonline.org>>. Acesso em: 19 de maio de 2013.

CRUZ, A.C.R.; VASCONCELOS, P.F.C. **Palestra: Arbovírus no Brasil**. *Biológico*, São Paulo, v.70, n.2, p.45-46, jul./dez. 2008.

CUTLER, R.G. In: Johnson JE Jr (ed) **Aging and cell function**. Plenum Press, New York, pp 1–148. 1984.

DARVESH, A.S.; BISHAYEE, A. 2010. **Selenium in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma**. *Anticancer Agents Med Chem* 10:338-345.

DE BRITO MAGALHÃES, C.L. *et al.* **Identification of a phylogenetically distinct orthobunyavirus from group C**. *Arch Virol*, 156; v. 7, p. 1173-1184, 2011.

DE BRITO MAGALHÃES, C.L. *et al.* **Caraparu virus (group C Orthobunyavirus): sequencing and phylogenetic analysis based on the conserved region 3 of the RNA polymerase gene**. *Virus Genes*, 35; v. 3, p. 681-684, 2007.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. **Regulation of cellular glutathione**. *Am J Physiol*; 257: L163±L173. 1989.

DEVAUX, C.A. **Emerging and re-emerging viruses: A global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks**. *World J Virol*, 12; v. 1, p. 11-22. 2012.

DIONISIO, D. *et al.* **Epidemiological, clinical and laboratory aspects of sandfly fever**. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 383–388). 2003.

DOCEUL, V. *et al.* **Epidemiology, molecular virology and diagnostics of Schmallerberg virus, an emerging orthobunyavirus in Europe**. *Veterinary Research* 44:31. 2013.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. **Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses**. In *Evolutionary Biology of Viruses*; Morse, S.S., Ed.; Raven Press: New York, NY, USA; pp.161–184. 1994.

DRAKE, J.W.; HOLLAND, J.J. **Mutation rates among RNA viruses**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 13910–13913. 1999.

DRÖGE, W.; ECK, H.P.; MIHM, S. **Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection**. *Methods Enzymol*, v. 233, p. 594-601. 1994.

DUYGU F, *et al.* **Relationship of Oxidative Stress in Hepatitis B Infection Activity with HBV DNA and Fibrosis**. *Ann Lab Med*; 32:113-118 <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.113>. 2012.

DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. *Ann. Med.* 27, 395. 1995.

- EIFAN, S. *et al.* **Non-Structural Proteins of Arthropod-Borne Bunyaviruses: Roles and Functions.** Reviews. *Viruses*, 5, 2447-2468; doi:10.3390/v5102447. 2013.
- ELLIOTT, R.M. **Nucleotide sequence analysis of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae.** *Virology* 173: 426- 436. 1989.
- ELLIOTT, R. M. *et al.* **Family Bunyaviridae**, p. 599 - 621. In van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L. (ed.), *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, Calif. 2000.
- ELLIOT, R.M.; WEBER, F. **Bunyaviruses and the Type I Interferon System (Review).** *Viruses*. V.1, p. 1003-1021. 2009.
- ENDRES, M.J. *et al.* **Neuroattenuation of an avirulent bunyavirus variant maps to the L RNA segment.** *J Virol* 1991, 65:5465–5470. 1991.
- ERGONUL, O. **Crimean-Congo haemorrhagic fever.** *Lancet Infect. Dis.* 6, 203–214. 2006.
- ERGONUL O. **Clinical and pathologic features of crimean-congo hemorrhagic fever.** In: Ergonul O, Whitehouse CA, editors. *Crimean-Congo hemorrhagic fever: a global perspective*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 2007.
- EVANS, M.D.; CHURCH, D.F.; PRYOR, W.A. **Aqueous cigarette tar extracts damage human a-1-proteinase inhibitor.** *Chem Biol Interact*; 79: 151±164. 1991.
- FAGBAMI, A.; TOMORI, O. **Tataguine virus isolations from humans in Nigeria, 1971–1975.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*;75(6):788. 1981.
- FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. **Free radicals, Antioxidants, and Nutrition.** *Nutrition*. 18: 872-879. 2002.
- FAUQUET, C.M. *et al.* **Family Bunyaviridae. In: Vírus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses.** (eds). San Diego, Elsevier Academic Press. p. 695-716. 2005.
- FERREIRA, I. B. *et al.* **Surveillance of Arbovirus infections in the Atlantic Forest region, state of São Paulo, Brazil. I- Detection of Hemagglutination-Inhibiting Antibodies in Wild birds between 1978 and 1990.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 36 (6), p. 265-274. 1994.
- FIGUEIREDO, L.T.M. **Vírus Brasileiros da Família Bunyaviridae.** Simpósio: *Virologia Médica II*. Capítulo IV, v.32, p. 154-158. Medicina, Ribeirão Preto. 1999.
- FIGUEIREDO, L.T.M. **Emergent arboviruses in Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 224-229. 2007.

Formação de espécies reativas (Figura 7). Disponível em: <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Super%C3%B3xido+Dismutase&lang=3> Acesso em: 10 de agosto de 2013.

FORMAN, H.J.; DICKINSON, D.A. **Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule.** Free Rad. Biol. Med. 37, 594–596. 2004.

FORSHEY, B.M. *et al.* **Febrile Surveillance Working Group. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America,** PLoS Negl Trop Dis 4(8) v. 787, p. 2000-2007, 2010.

Genomic replication strategies of viruses. Disponível em: <<http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/bunya.gif>>. Acesso em: 10 set. 2009.

GIL, L. *et al.* **Evaluation of redox status and immunological indicators in HTLV-I seropositive subjects.** Bioquimia, v.27, p. 26-31. 2002.

GIL, L. *et al.* **Oxidative stress in adult dengue patients.** Am J Trop Med Hyg 71:652-657. 2004.

GONZALEZ-SCARANO, F. *et al.* **Genetic determinants of the virulence and infectivity of La Crosse virus.** Microb Pathog. J Virol, 4:1–7. 1988.

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

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.

HALLIWELL, B. **Reactive oxygen species and the central nervous system.** J Neurochem; 59: 1.609-23. 1992.

HALLIWELL, B. **Antioxidants in human health and disease,** Ann. Rev. Nutr. 33–50. 1996.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. **Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress.** Environ. Health Perspect. 102 (Suppl. 10):5–12. 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Clarendon Press, Oxford.1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** *Methods Enzymol*; 186: 1-85. 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine,** 3rd ed., Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th edn. Clarendon, Oxford. 2007.

HART, T.J.; KOHL, A.; ELLIOTT, R.M. **Role of the NSs protein in the zoonotic capacity of orthobunyaviruses**. *Zoonoses Public Health*, 56, 285-296. 2009.

HEFFNER, J.E.; REPINE, J.E. **Pulmonary strategies of antioxidant defense**. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140, 531–554. 1989.

HENNING, K.J. **What is syndromic surveillance?** *Morb Mortal Weekly Rep Suppl*;53:7–11. 2004.

HOLLIDGE, B. S.; GONZALEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S. S. **Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis**. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 5(3), 428-42, Epub 2010/07/24. 2010.

HOLLIDGE, B. S.; WEISS, SUSAN, R.; SOLDAN, S. S. **The Role of Interferon Antagonist, Non-Structural Proteins in the Pathogenesis and Emergence of Arboviruses**. *Review. Viruses*, 3, 629-658; doi:10.3390/v3060629. 2011.

HOOGSTRAAL, H. **The epidemiology of tick-borne Crimean-Congo hemorrhagic fever in Asia, Europe, and Africa**. *J. Med. Entomol.* 15, 307–417. 1979.

HOSAKOTE, Y.M. *et al.* **Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis**. *Am J Respir Crit Care Med.*, v. 183, p. 1550-1560. 2011.

HOSAKOTE, Y. M. *et al.* **Respiratory Syncytial Virus Induces Oxidative Stress by Modulating Antioxidant Enzymes**. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.41,p. 348–357. 2009.

HUANG, S.H. *et al.* **Inhibitory effect of melatonin on lung oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection in mice**. *J Pineal Res*, v.48, p.109-116. 2010.

HWANG, C.; SINSKY, A.J.; LODISH, H.F. **Oxidised redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum**. *Science*, 257:1496-1502. 1992.

IGNARRO, L. J. **Rev. Farm. Bioquim.** Univ. S. Paulo. 34 (C04), 3. 1998.

ISAÄCSON, M. **Viral hemorrhagic fever hazards for travelers in Africa**. *Clin Infect Dis* 2001; 33 (10):1707–12; 56. Whitehouse CA, Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res*; 64(3):145–60). 2004.

IVERSSON, L. B. **Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico, sobre arbovirus patogênicos para o homem na Região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo**. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 343-353. 1994.

IVERSSON, L.B. *et al.* **Human disease in Ribeira Valley, Brazil caused by Caraparu, a group C arbovirus- report of a case**. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 29, p.112-117. 1987.

- JONES, D. P. **Redefining oxidative stress.** *Antioxid.Redox.Signal.* 8, 1865-79. 2006.
- JONES, K.E. *et al.* **Global trends in emerging infectious diseases.** *Nature* 2008; 451(February (7181)):990–3. 2008.
- JORDÃO JR, A. A. *et al.* **Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E.** *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 434-449. 1998.
- JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. **Molecular Toxicology**, 1st ed., Oxford University Press: New York, p.152-186. 1997.
- KANZOK, S. M. *et al.* *J. Mol. Biol.* 2000, 275, 40180; RAHLFS, S.; SCHIRMER, R. H.; BECKER, K.; *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59, 1024; RAHLFS, S. *et al.* *Biol. Chem.* 2003, 348, 551.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**, 3rd. ed. San Antonio, USA: The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1141p. 1985.
- KINNULA, V.L.; CRAPO, J.D.; RAIVIO, K.O. **Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung.** *Lab. Invest.* 73, 3–19. 1995.
- KLASSEN, P. *et al.* **Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants.** *Nutrition* 20:542-547. 2004.
- KLEIKERS, P.W. *et al.* **NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury.** *J. Mol. Med. (Berl)* 90, 1391–1406. 2012.
- KOCHS, G. *et al.* **Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, tissue 5, p. 3153-3158. 2002.
- KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. **Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer.** *Curr. Med. Chem.*, 8, 773–796. 2001.
- KOVACIC, P. *et al.* **Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships.** *Curr. Med. Chem.* 12, 2601– 2623. 2005.
- 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.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 18, 608–637. 2005.
- LEES, J.F. *et al.* **Nucleotide sequence of the Bunyamwera virus M RNA segment: Conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product.** *Virology* 148: 1-14. 1986.

LE MAY, N.; BOULOY, M. **Antiviral escape strategies developed by bunyaviruses pathogenic for humans.** *Front Biosci (Schol Ed)*, v. 1, p. 1065-1077. 2012.

LENAZ, G. **Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology?** *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 93–136. 2012.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. **Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins.** *Methods Enzymol.* 233, 346-57. 1994.

LIU, T. *et al.* **Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: role of tyrosine phosphatases.** *J Biol Chem* 279:2461-2469. 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J.Biol.Chem.* 193, 265-75. 1951.

MACHIDA, K. *et al.* **Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation.** *J Virol* 80:7199-7207. 2006.

MASTERS, C.; PEGG, M.; CRANC, D. **On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver.** *Mol Cell Biochem* 70:113–120. 1986.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. **Glutathione.** *Annual Reviews of Biochemistry*, 45:711-760. 1983.

MELTZER, E. **Arboviruses and Viral Hemorrhagic Fevers (VHF).** *Infect Dis Clin N Am* 26 (2012) 479–496. 2012.

MERTZ, G. J. **Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses.** In: RICHMAN DD; WHITLEY RJ & HAYDEN FG, eds. *Clinical virology*, Churchill-Livingstone, New York, p. 943-972. 1997.

Microscopia eletrônica adaptada. Disponível em:
<www.stanford.edu/group/virus/bunya/2004mendez> Acesso em: 07 jul. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Capítulo 5.36. *Viroses Emergentes.* 1998.

MONATH, T.P. Yellow Fever. In: **The Arboviruses: ecology and epidemiology.** Monath, T.P. (ed.), v. 5. CRC Press, Boca Raton, USA.p. 139-241. 1988.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. **Pharmacol.** *Rev.* 43, 109. 1991.

MORENS, D.M.; FOLKERS, G.K.; FAUCI, A.S. **The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases.** *Nature*; 430:242–249. 2004.

- NAKASHIMA, I. *et al.* **4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions.** *Mol. Aspects Med.* 24, 231–238. 2003.
- NARAYANAN, A. *et al.* **Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection.** *PLoS One*, v. 6:e20354. 2011.
- NICHOL, S.T.; ARIKAWA, J.; KAWAOKA, Y. **Emerging viral diseases.** *Proc Natl Acad USA*, v. 97, p. 12411-12412. 2000.
- NOVELLA, I. S. *et al.* **Specific and nonspecific host adaptation during Arboviral Experimental Evolution.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011;21:71–81. 2012.
- NOVOA, R.R. *et al.* **Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus.** *Journal of Virology*, v. 79, p. 10852-10863. 2005.
- NUNES, M.R.T. *et al.* **Molecular epidemiology of group C viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) isolated in the Americas.** *J Virol*, v.79, p. 10561-10570. 2005.
- PAL, S. *et al.* **Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1.** *J Gastroenterol Hepatol*, v. 25, p. 627- 634. 2010.
- PALAMAR, A. T. *et al.* **Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione.** *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 12, p. 1373–1381. 1996.
- PALAMAR, A. T. *et al.* **Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication.** *Antiviral Res*, v.27, p. 237–253. 1995.
- PAP, A. *et al.* **Role of xanthine oxidase activation and reduced glutathione depletion in rhinovirus induction of inflammation in respiratory epithelial cells.** *J Biol Chem* , v.283, p.28595–28606. 2008.
- PASTOR, N. *et al.* **A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding.** *J. Mol. Biol.*, 304, 55–68. 2000.
- PERRY, J.J.P. *et al.* **The structural biochemistry of the superoxide dismutases.** Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804. 245–262. 2010.
- PETERHANS, E. **Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation.** *J Nutr*, v.127, p. 962S-965S. 1997a.
- PETERHANS, E. **Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases.** *Biol Trace Elem Res*, v. 56, p.107-116. 1997b.
- PINHEIRO, F. P. **Arboviral zoonoses in South America**, p. 159. *In* J. H. Steele and G. W. Beron (ed.), *CRC handbook series in zoonoses*, section B: viral zoonoses. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1981.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. **Arboviral zoonoses of Central and South America**, p. 214–217. In G. Beran (ed.), Handbook of zoonoses. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1994.

PINHEIRO, F.P. *et al.* Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, Vol. 1, 1986. p.375-408. 1986.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. **Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. Review**. European Journal of Pharmacology 533. 222–239). 2006.

RATNAM, D.V. *et al.* **Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective**. Journal of Controlled Release, v. 113, p. 189–207. 2006.

RIDNOUR, L. A. **Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13147–13152. 2005.

ROTRUCK, J.T., *et al.* **Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase**. Science, 179:588-590. 1972.

SALANUEVA, I. J. *et al.* **Polymorphism and Structural Maturation of Bunyamwera Virus in Golgi and Post-Golgi Compartments**. *Journal of Virology*, v. 77, No 2, p.1368-1381. 2003.

SARKADI, B. *et al.* **Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system**. *Physiological Reviews*, v. 86, p. 1179-1236. 2006.

SAUTTO, G. *et al.* **Possible Future Monoclonal Antibody (mAb)-Based Therapy against Arbovirus Infections. Review**. BioMed Research International Volume 2013, Article ID 838491, 21 pages. 2013.

SCHMALJOHN C. S.; NICHOL S.T. **The *Bunyaviridae***. In Fields Virology, 5th ed., D.M. Knipe, P.M. Howley (eds.), Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1741-1780. 2007.

SCHWARZ, K.B. **Oxidative stress during viral infection: a review**. Free Radic Biol Med, v. 21, p.641-649. 1996.

SCOTT, M. D. *et al.* **Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase**. *J Lab Clin Med*, 118: 7-16. 1991.

SEET, R.C. *et al.* **Oxidative damage in dengue fever**. Free Radic Biol Med 47:375-380. 2009.

SHI, X. *et al.* **Requirement of the nterminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis**. *J Virol*, 80, 8089-8099. 2006.

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

SHOPE, R. E.; WHITMAN, L. **Nepuyo virus, a new group C agent isolated in Trinidad and Brazil. II Serological studies**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15:772.1966.

SHOPE, R. E.; WOODALL, J. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. **The epidemiology of disease caused by viruses in group C and Guama' (*Bunyaviridae*)** p. 37-52. In T. P. Monath (ed.), *The arboviruses: epidemiology and ecology*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1988.

SIES, H. **Glutathione and its cellular functions**. Free Radic Biol Med, 27:916-921. 1999.

SIES, H. **Strategies of antioxidant defense**. Eur J Biochem 215:213-21. 1993.

SIES, H.; MOSS, K. M. **A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver**. Eur J Biochem, v.84, n.2, p.377-383. 1978.

SILVA, M. **Participação e homeostase do ferro no diabetes tipo 1 em modelos animais**. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Biologia da Universidade Federal de Ouro Preto. 2011.

SIMIC, M.G. **Oxygen radicals in biology and medicine**. Plenum, New York. 1988.

SLEKAR, K. H.; KOSMAN, D. J.; CULOTTA, V. C. **The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection**. J Biol Chem, v. 271, n. 46, p.28831-28836. 1996.

SOLDAN, S. S.; GONZALEZ-SCARANO, F. **Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae**. J Neurovirol;11(October (5)):412-23. 2005.

STEBBENS, W.E. **Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS**. Exp Mol Pathol 77:121-132. 2004.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.C.; GASQUE, P. **Arthritogenic alphaviruses - an overview**. Nat Rev Rheumatol. May. 2012.

TIAN, Y. *et al.* **Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production**. Biochem Biophys Res Commun, v. 397, p. 420-424. 2010.

TOMOR, O. *et al.* **Bwamba virus infection: a sero-survey of veterbrates in five ecological zones in Nigeria**. Trans R Soc Trop Med Hyg; 68(6):461-5. 1974.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. *et al.* **Arboviroses: Aspectos virológicos**. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, p.365-373. 1986.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. *et al.* **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico.** Leão, R. N. Q. (ed). Belém: editora CEJUP Press, p. 208- 225. 1997.

TURELL, M.J. *et al.* **Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru.** J Med Entomol 42: 891–898. 2005.

VALKO, M. *et al.* **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int J Biochem Cell Biol 39:44–84. doi:10.1016/j.biocel. 2006.07.001. 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. **Metals, toxicity and oxidative stress.** Curr. Med. Chem. 12.1161–1208. 2005.

VALKO, M. *et al.* **Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer?** *Biochim. Biophys. Acta*, 1527, 161–166. 2001.

VALKO, M. *et al.* **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1–40. 2006.

VASCONCELOS, H.B. **Epidemiologia Molecular do Vírus Oropouche (Bunyaviridae: Orthobunyavirus) Na Amazônia Brasileira.** 140f..Dissertação (Mestrado em Biologia de agentes infecciosos e parasitários). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

VASCONCELOS, P.F. *et al.* **Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia.** Ciênc Cult 44: 117- 124. 1992.

VASCONCELOS, H. B. *et al.* **Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates.** J Clin Virol, 44(2):129–33. 2009.

VASCONCELOS, P.F.C. *et al.* **Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries.** Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C, Travassos da Rosa, J.F.S. (eds.). Belém: Instituto Evandro Chagas, p. 72-99. 1998.

VERMEULEN, P.B. *et al.* **Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation.** European Journal of Cancer, v. 32A, n. 14, p. 2474-84. 1996.

WALTER, C.T.; BARR, J.N. **Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses(Review).** Journal of General Virology.v.92, p. 2467-2484. 2011.

WANG, J. *et al.* **Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice.** Plos One, v.8, pp e55407. 2013.

WANG, T.; WEINMAN, S.A. **Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C.** J Gastroenterol Hepatol 21:S34-37. 2006.

WEAVER, S.C. **Evolutionary influences in arboviral disease.** Curr. Topics Microbiol. Immunol., 299, 285–314. 2006.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. **Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease.** Nature reviews Microbiology, 2(10), 789-801, Epub 2004/09/21). 2004.

WHO, World Health Organization, 1985.

XU, C.; LI, C.Y.; KONG, A.N. **Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics.** Archives of Pharmacal Research, v. 28, p. 249-268. 2005.

YAHYA, RS *et al.* **Role of interleukin-8 and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma.** Clin Lab. 59(9-10):969-76. 2013.

ZACKS, M.A.; PAESSLER, S. **Encephalitic alphaviruses.** Vet Microbiol; 140(January (3–4)):281–6. 2010.

ANEXOS

1) Comprovante do Comitê de Ética dos animais:

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

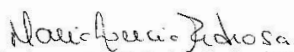
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 2011/17, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Avaliação do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes após infecção experimental pelo vírus Caraparu (Orthobunyavirus do grupo C)*", que tem como responsável a Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em Julho/2014.

Ouro Preto, 06 de Julho de 2011.


Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP

2) Comprovante de submissão de artigo científico

Revisions Being Processed for Author **Cintia Lopes de Brito Magalhães, Ph.D.**

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
Action Links	AVIROL-D-13-00609R1	Caraparú virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection	09 Dec 2013	22 Jan 2014	Required Reviews Completed

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

ORIGINAL ARTICLE

Title Page

“Caraparú virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection”

Authors

Fernanda Caetano Camini^{1,2}, Letícia Trindade Almeida², Carolina Silva Bernardes², Maísa Silva², Maria Lúcia Pedrosa^{1,2}, Daniela Caldeira Costa^{1,2}, Wanderson Geraldo de Lima^{1,2}, Carla do Amaral Pinto³, Paulo César Peregrino Ferreira³, José Carlos de Magalhães⁴ and Cintia Lopes de Brito Magalhães^{1,2*}

Abstract Oxidative stress is a disturbance in the oxidant-antioxidant balance leading to potential cellular damage. Most cells can tolerate a mild degree of oxidative stress because they have a system that counteracts oxidation that includes antioxidant molecules such as glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD). Disruption of the host antioxidant status has been recognized as an important contributor to the pathogenesis of many viruses. Caraparú virus (CARV) is a member of group C of the *Bunyaviridae* family of viruses. In South American countries, group C bunyaviruses are among the common agents of human febrile illness and have caused multiple, notable outbreaks of human disease in recent decades; nevertheless, little is known about the pathogenic characteristics of these viruses. The purpose of this study was to examine the hepatic pathogenesis of CARV in mice and the involvement of oxidative stress and antioxidant defenses on this pathology. Following subcutaneous infection of BALB/c mice, CARV was detected in the liver and histopathology revealed acute hepatitis. Increased serum levels of aspartate and alanine aminotransferases (AST/ALT) and greater hepatic expression of the proinflammatory cytokine Tumor necrosis factor- α (TNF- α) were found in infected animals. The CARV-infection did not alter the biomarkers of oxidative stress but caused increased GSH content and altered expression and activity of SOD. This is the first report of an alteration of oxidative homeostasis upon CARV infection, which may, in part, explain the hepatic pathogenesis of this virus, as well as the pathogenesis of other *Bunyaviridae* members.

3) Trabalhos apresentados em congressos

certificate

XXIII Congresso Brasileiro de Virologia
VII Encontro de Virologia do Mercosul



We hereby certify that the abstract entitled
CHARACTERIZATION OF CARAPARU VIRUS (BUNYAVIRIDAE) LIVER INFECTION IN THE BALB/C MICE

authored by
Costa, A.C.T., Almeida, L.T., Bernardes, C.S., Camini, F.C., Silva, M., Pedrosa, M.L., Lima, W.G.,
Pinto, C.A., Ferreira, P.C.P., Magalhães, J.C., Magalhães, C.L.B.

was presented at the XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting
of Virology (XXIII CBV), from September 30 to October 3, 2012, in Foz do Iguaçu - PR,
Brazil, at the Rafain Palace Hotel & Convention Center.

Organization _____



Dr. Amauri Alcindo Alfieri | Organizing Committee



certificate

XXIII Congresso Brasileiro de Virologia
VII Encontro de Virologia do Mercosul



We hereby certify that the abstract entitled
INFECTION BY CARAPARU VIRUS (BUNYAVIRIDAE) MODULATES ACTIVITY AND GENE EXPRESSION OF ANTIOXIDANTS ENZYMES IN MICE LIVER

authored by
Bernardes, C.S., Almeida, L.T., Costa, A.C.T., Camini, F.C., Silva, M., Rossoni-Júnior, J.V.,
Pedrosa, M.L., Lima, W.G., Pinto, C.A., Ferreira, P.C.P., Magalhães, J.C., Magalhães, C.L.B.

was presented at the XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting
of Virology (XXIII CBV), from September 30 to October 3, 2012, in Foz do Iguaçu - PR,
Brazil, at the Rafain Palace Hotel & Convention Center.

Organization _____



Dr. Amauri Alcindo Alfieri | Organizing Committee



certificate



XXIII Congresso Brasileiro de Virologia
VII Encontro de Virologia do Mercosul



We hereby certify that the abstract entitled
EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN MURINE MODEL OF HEPATIC INFECTION BY CARAPARU VIRUS (BUNYAVIRIDAE)

authored by
Almeida, L.T., Bernardes, C.S., Costa, A.C.T., Camini, F.C., Silva, M., Souza, M.O., Pedrosa, M.L.,
Lima, W.G., Pinto, C.A., Ferreira, P.C.P., Magalhães, J.C., Magalhães, C.L.B.

was presented at the XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting
of Virology (XXIII CBV), from September 30 to October 3, 2012, in Foz do Iguaçu - PR,
Brazil, at the Rafain Palace Hotel & Convention Center.

Organization _____



Dr. Amauri Alcindo Alfieri | Organizing Committee




XXIV Congresso Brasileiro de Virologia
VIII Encontro de Virologia do Mercosul

01 a 04 de setembro | 2013 | Porto Seguro | Náutico
Bahia - Brasil | Praia Hotel & Convention Center



Certificate

We hereby certify that the abstract entitled
ALTERATION ON PROTEIN EXPRESSION OF SUPEROXIDE DISMUTASE 1 ON LIVER OF BALB/C MICE AFTER INFECTION BY CARAPARU VIRUS (BUNYAVIRIDAE)

authored by CAMINI, F.C., FERREIRA, P.N., ALMEIDA, L.T., BERNARDES, C.S., SILVA, M., PEDROSA, M.L.,
PINTO, C.A., FERREIRA, P.C.P., MAGALHÃES, J.C., MAGALHÃES, C.L.B.

was presented at the XXIV Brazilian Congress of Virology & VIII Mercosur Meeting of Virology
held in Porto Seguro - BA, Brazil, on September 1st - 4th, 2013.

| Organization _____



Dr. Eurico de Arruda Neto
Presidente do XXIV CBV





XXIV Congresso Brasileiro
de **Virologia**

VIII Encontro de Virologia do Mercosul

01 a 04 de setembro | 2013 | Porto Seguro | Náutico
Bahia - Brasil | Praia Hotel & Convention Center



Certificate

We hereby certify that the abstract entitled
CARAPARU VIRUS (BUNYAVIRIDAE) INFECTION INCREASE GENE EXPRESSION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE AND TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA ON LIVER OF BALB/C MICE

authored by ALMEIDA, L.T., FERREIRA, P.N., CAMINI, F.C., BERNARDES, C.S., SILVA, M., PEDROSA, M.L., PINTO, C.A., FERREIRA, P.C.P., MAGALHÃES, J.C., MAGALHÃES, C.L.B.

was presented at the XXIV Brazilian Congress of Virology & VIII Mercosur Meeting of Virology held in Porto Seguro - BA, Brazil, on September 1st – 4th, 2013.

Dr. Eurico de Arruda Neto
Presidente do XXIV CBV

Organization

