



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde**

Carolina Colombelli Pacca

**BUSCA DE COMPOSTOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA OS VIRUS
DA FEBRE AMARELA E ENCEFALITE DE
SAINT LOUIS**

**São José do Rio Preto
2013**

Carolina Colombelli Pacca

SCREENING DE NOVOS ANTIVIRAIS
INIBIDORES DE *FLAVIVIRUS*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto
2013

Pacca, Carolina Colombelli
Screening de Novos Antivirais Inibidores de *Flavivirus*/Carolina
Colombelli Pacca.

São José do Rio Preto, 2013

75 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

1. Flavivirus; 2. Antiviral; 3. Vírus da Febre amarela; 4. Vírus de
Saint Louis; 5. SLEV; 6. YFV;

CAROLINA COLOMBELLI PACCA

**Screening de novos Antivirais Inibidores de
*Flavivirus***

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda
Nogueira

2º Examinador: Prof. Dr. Victor Hugo de A. Quintana

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Danielle Muller

4º Examinador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. Gisela Cipullo Moreira

Suplentes: Prof. Dr. Mauro Teixeira

Prof^a. Dr^a. Giovana Mussi Polachini

São José do Rio Preto_01/11/2013.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	<i>i</i>
Agradecimentos.....	<i>ii</i>
Epígrafe.....	<i>iv</i>
Lista de Figuras.....	<i>v</i>
Lista de Tabela.....	<i>vi</i>
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	<i>vii</i>
Resumo.....	<i>x</i>
Abstract.....	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Arbovírus.....	02
1.2. Família <i>Flaviviridae</i> - Gênero <i>Flavivirus</i>	04
1.3. Estrutura, Genoma e Replicação de Flavivírus	05
1.4. Febre Amarela.....	10
1.5. Encefalite de Saint Louis.....	12
1.6. Relevância e Justificativa.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Culturas Celulares.....	21
3.2. Produção Viral.....	21
3.3. Titulação Viral.....	22

3.4. Síntese dos Compostos.....	22
3.5. Avaliação da Citotoxicidade.....	23
3.6. Ensaio de Redução de Placas.....	24
3.7. Eficiência da inibição da replicação viral em células tratadas segundo imunofluorescência.....	24
3.8. Análise do efeito antiviral pela viabilidade celular.....	25
3.8.1. Pré-tratamento.....	25
3.8.2. Pós-Tratamento.....	26
3.8.3. Avaliação do efeito simultâneo dos compostos na infecção viral.....	26
3.9. Análise da Inibição da Replicação Viral de Células tratadas através da Citometria de Fluxo	27
3.10. Teste de infecção em camundongos nocautes para receptores de <i>Interferon</i> α e β (ABR).....	28
3.10.1. Camundongos.....	28
3.10.2. Infecção dos camundongos e processamento das amostras.....	28
3.10.3. Ensaios Bioquímicos.....	28
3.10.4. Análise histopatológica do fígado dos camundongos inoculados com YFV.....	29
3.10.5. Titulação viral.....	29
3.10.6. PCR em Tempo Real (qPCR) para a avaliação da replicação de YFV.....	29
3.10.7. Ensaio de Neutralização.....	30
4.RESULTADOS.....	31
4.1. Síntese dos compostos.....	32

4.2. Avaliação da Citotoxicidade.....	33
4.3. Eficiência da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas.....	35
4.4. Eficiência da inibição da replicação viral em células tratadas segundo imunofluorescência.....	36
4.5. Análise do efeito antiviral pela viabilidade celular.....	39
4.6. Análise da Inibição da Replicação Viral de Células tratadas através da Citometria de Fluxo	41
4.7. Inoculação dos camundongos com YFV.....	44
4.7.1. Ensaio Bioquímicos.....	45
4.7.2. Análise histopatológica do fígado dos camundongos inoculados com YFV.....	46
4.7.3. PCR em Tempo Real (qPCR) para a avaliação da replicação de YFV...	49
4.7.4. Ensaio de Neutralização.....	49
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida, meu alicerce:

Vlamir, Waldomiro, Heloisa, Felipe e Juliana.

Sem vocês nada disso seria possível. Vocês são meus exemplos de vida.

*Obrigada pelo investimento e confiança depositada em mim e por me estimularem a
sempre querer mais acreditando que dará certo.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu anjo da guarda.
- ❖ Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela oportunidade e confiança depositada. Obrigada pelo trabalho oferecido, pela amizade e pelos ensinamentos científicos e intelectuais neste período. Deixo aqui meu imenso respeito a você, seus ensinamentos levarei pelo resto da vida.
- ❖ Às minhas grandes amigas e companheiras nestes anos todos de pesquisa: Aninha e Gislaine. Meu muito obrigado pelo companheirismo, apoio, ajuda, bebedeiras, cachorro-quente e brigadeiro que nos fizeram engordar. Além das várias horas na bancada.
- ❖ À Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite (UFPE) e seu grupo, pela cessão das moléculas estudadas.
- ❖ A todos os meus amigos que participaram dessa jornada: LG (Lisandra Gomes), Ju Carmona, Téli (Fernanda Tollentino), Garotas da Távola Redonda, Farmacêuticas Super Poderosas e todos os outros aqui não mencionados, obrigada por me incentivarem, por me alegrarem em momentos difíceis e por fazerem parte da minha vida
- ❖ Aos novos amigos Rafael Elias, Andre Delorme e Luana Cristiny pela essencial ajuda no desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ Aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos, disponibilidade e dedicação aos alunos.
- ❖ À Família Terzian: pela amizade e pelos vários almoços que me proporcionaram. À Família Dutra: pelo carinho e pimenta cedida.
- ❖ À amiga Roberta Vieira de Moraes Bronzoni. Mesmo de longe, seus princípios e dedicação que teve comigo serão sempre lembrados. Obrigada pela amizade.

- ❖ Ao Laboratório de Pesquisas em Virologia – FAMERP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.
- ❖ Aos Drs. Luiz Tadeu de M. Figueiredo (USP – Ribeirão Preto), Dr. Charles Rice (Rockefeller University) e Dr. Mauro Teixeira (UFMG) pela cessão de reagentes e animais.
- ❖ Aos funcionários e alunos do Laboratório Microbiologia – FAMERP: Profa. Dra. Margarete, Natália; Laboratório de Marcadores Moleculares e Bioinformática: Profa. Eloiza e Tiago; Laboratório de Estudo Genômicos: Profa. Dra. Paula Rahal, Carol Jardim, Cintia, Marília; DNapta: Paulinho Peitl, Sergio Aoki, Valéria, Lilian por me socorrerem durante os experimentos.
- ❖ À galera do café do Bloco U6: Gislaine, Aninha, Tiago, Rodrigo, Tialfi, Katia “Frávia”, seu João. Uma pausa durante o dia para uma fofoca sempre faz bem.
- ❖ Aos novos alunos e aos veteranos do Laboratório de Pesquisa em Virologia.
- ❖ À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.
- ❖ Aos “não-amigos” por me ensinarem a lidar com situações adversas e a me lembrarem que tudo muda. Obrigada por me ajudarem a melhorar como pessoa e profissional, pois não repetirei as mesmas atitudes.
- ❖ A todas as pessoas aqui não mencionadas e que, de alguma forma, participam da minha vida, deixo aqui, com muito carinho, o meu muito obrigada.
- ❖ À Deus, por tudo.

Muito Obrigada!

Carol

“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz homens sábios e a humildade faz grandes homens”.

(Dalai Lama)

“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência”.

(Chico Xavier)

Lista de Figuras

Figura 1.	Estrutura esquemática dos vírus pertencentes à família <i>Flaviviridae</i>	05
Figura 2.	Organização genômica dos <i>Flavivirus</i>	06
Figura 3.	Ciclo de replicação viral de <i>Flavivirus</i>	09
Figura 4.	Estrutura química das tiossemicarbazonas e phtalyl-tiazol avaliadas.....	32
Figura 5.	Avaliação da Citotoxicidade.....	34
Figura 6.	Ensaio de Redução de Placa - YFV.....	35
Figura 7.	Ensaio de Redução de Placa – SLEV.....	36
Figura 8.	Imunofluorescência das células infectadas com YFV e tratadas com compostos	37
Figura 9.	Imunofluorescência das células infectadas com SLEV e tratadas com compostos	38
Figura 10.	Viabilidade Celular – YFV.....	39
Figura 11.	Viabilidade Celular – SLEV.....	40
Figura 12.	Citometria de Fluxo de células desafiadas com YFV e tratadas durante 48h.....	41
Figura 13.	Citometria de Fluxo de células desafiadas com YFV e tratadas durante 24h.....	42
Figura 14.	Citometria de Fluxo de células desafiadas com SLEV e tratadas durante 48h.....	43
Figura 15.	Citometria de Fluxo de células desafiadas com SLEV e tratadas durante 24h.....	43
Figura 16.	Análise Histopatológica dos fígados dos animais.....	47
Figura 17.	Análise Histopatológica dos fígados dos animais.....	48
Figura 18.	Avaliação da replicação viral por qPCR.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Identificação dos camundongos utilizados e quantidade de vírus inoculado.....	44
Tabela 2. Determinação dos testes bioquímicos e hematológicos.....	45
Tabela 3. Valores de Referencia de animais segundo Carpenter, 2010.....	46
Tabela 4. Ensaio de Neutralização dos camundongos.....	50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	microMolar
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSQV	Virus Bussuquara
C	Proteína do capsídeo viral
CC ₅₀	Concentração Citotoxicidade 50%
cDNA	DNA complementar
CMC	Carboximetilcelulose
DENV	Virus Dengue
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
dsDNA	<i>Double strand DNA</i>
E	Proteína do envelope viral
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i>
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Simples Virus
IFN	<i>Interferon</i>
IgG	Imunoglobulina G
ILHV	Virus Ilhéus
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
KCl	Cloreto de potassio
L15	Meio Leibovitz
M	Molar

MAYV	Vírus Mayaro
MEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	milimolar
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
Na ₂ HPO ₄	Hidrogenofostato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NCR	<i>Non coding region</i>
nm	Nanomêtro
NS	Proteína não-estrutural
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2A
NS2B	Proteína não-estrutural 2B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5	Proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
OROV	Vírus Oropouche
p/v	Peso por volume
pb	par de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFU	Unidade formadora de placa
pH	Potencial hidrogeniônico
prM	Proteína precursora da proteína M
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro

ROCV	Vírus Rocio
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
ssDNA	<i>Single strand DNA</i>
ssRNA	<i>Single strand RNA</i>
U	Unidade
UTR	<i>Untranslated Region</i>
v/v	Volume por volume
WNV	Vírus West Nile
YFV	<i>Yellow fever virus</i> – vírus da Febre Amarela
ng	Nanograma
pmol	Picomol
iRNA	Interferência de RNA

Resumo

Introdução: Os arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, são frequentemente associadas a surtos em seres humanos e representam um problema sério de saúde pública. Os vírus pertencentes ao gênero Flavivirus, tais como vírus da Febre Amarela (YFV) e vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), são importantes patógenos que podem causar alta taxa de morbidade e mortalidade no mundo. No Brasil, YFV é mantido em ciclo silvestre notificados anualmente, a despeito da segurança e eficiência da vacina. A encefalite de Saint Louis é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo SLEV amplamente distribuída nas Américas. A emergência do SLEV passou a ser um fato preocupante no Brasil a partir da constatação do primeiro surto no país em 2006, na cidade de São Jose do Rio Preto. Não existe tratamento específico para estas viroses, somente tratamento de suporte para ajudar a aliviar os sintomas e prevenir complicações. Desta forma, há uma grande necessidade de que sejam desenvolvidos antivirais efetivos e seguros para o tratamento destas infecções. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi identificar potenciais compostos antivirais contra os arbovírus causadores de doença febril aguda e encefalites (YFV e SLEV) *in vitro* e avaliar a capacidade de inibição da replicação viral dos compostos *in vivo* em camundongos ABR. **Materiais e Métodos:** Para tanto, foram realizados ensaios de redução de placas, citometria de fluxo, imunofluorescência, bem como testes de viabilidade celular para as análises *in vitro*. Além disto, camundongos ABR foram inoculados com YFV e seus materiais biológicos testados para a presença de partículas virais por ensaio de redução de placas e qPCR. Adicionalmente, foi realizado ensaio de neutralização do soro dos animais. **Resultados:** Celulas tratadas com os compostos mostraram eficiente inibição da replicação viral em concentrações que apresentam baixa citotoxicidade. Os ensaios

mostraram que derivados de ftalyl-tiazole e fenoxytiosemicarbazone foram os mais eficazes na ação antiviral, apresentando redução de 60% e 75% para YFV e SLEV, respectivamente. Camundongos ABR inoculados com YFV apresentaram alterações histológicas no fígado, entretanto, não foi constatado título viral nas amostras testadas. O ensaio de neutralização mostra altas concentrações de anticorpos no soro dos animais.

Conclusões: A inibição da replicação foi comprovada por vários ensaios *in vitro* evidenciando as moléculas como potentes alternativas para o tratamento dos vírus. Mais estudos são necessários para a determinação do mecanismo de ação destas moléculas. Os camundongos apresentaram alterações histopatológicas sendo um indicativo de infecção, entretanto, apresentam altas taxas de anticorpos. Mais estudos sobre modelo animal são necessários para a realização de ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: 1. *Flavivirus*; 2. Encefalite Saint Louis; 3. Febre amarela; 4. Antiviral;

ABSTRACT

Introduction. Arboviruses, arthropod-borne viruses, are frequently associated with human outbreaks and represent a serious health problem. The genus Flavivirus, which includes both the Yellow Fever Virus (YFV) and Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV), are important pathogens that result in high morbidity and mortality rates worldwide. In Brazil, YFV has a sylvatic cycle and occurs annually, despite the efficiency of the vaccine. Saint Louis Encephalitis is an infectious illness that can cause acute fever caused by SLEV, which is widely distributed in the Americas. The emergence of SLEV became a serious concern after the first related outbreak in Brazil in 2006, in the city of Sao Jose do Rio Preto. There is no specific antiviral drug for these viruses, only supporting treatment that can alleviate the symptoms and prevent complications. The need to develop effective and safe antiviral drugs is indispensable for the treatment of these infections. **Objective.** The aim of this work was to identify new possible antiviral drugs against the arboviruses that can cause acute fever and encephalitis (YFV and SLEV) and to evaluate the capacity of inhibition of these compounds in ABR mice. **Material and Methods.** Plaque reduction assay, flow cytometry, immunofluorescence and cellular viability were used to test the compounds *in vitro*. ABR mice were inoculated with YFV, and the biological samples were tested for the presence of the virus through the use of plaque reduction assay and qPCR. Neutralization assay was also performed. **Results.** Treated cells showed efficient inhibition of viral replication at concentrations that presented minimal toxicity to the cells. The assays showed that flaryl-tiazole and fenoxytiosemicarbazone were more effective, and that they reduced viral replication by 60% and 75% for YFV and SLEV, respectively. The analysis also revealed that the ABR mice inoculated with YFV had

histopathological alterations in the liver; however, the samples did not present viral title. Neutralization assay showed a high concentration of antibodies in the serum.

Conclusion. The inhibitions of viral replication were confirmed through the use of some assays *in vitro*, and the effectiveness of the selected compounds show that they are an option in the treatment of these viruses. More detailed studies are needed to determine the mechanism of action of these molecules. The mice were found to have histopathological alterations, which indicates viral infection; however, they also presented with high concentrations of antibodies. More studies about animal models are necessary to make *in vivo* experiments.

Keywords: 1. *Flavivirus*; 2. Saint Louis Encephalitis Virus; 3. Yellow Fever; 4. Antiviral;

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Arbovírus

Classificados eminentemente de forma epidemiológica, arbovírus (*arthropod borne viruses*) são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos a hospedeiros vertebrados suscetíveis. As arboviroses são freqüentemente associadas a surtos em seres humanos e representam um problema sério de saúde pública. Apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, mas estão presentes predominantemente nos trópicos, devido às condições climáticas favoráveis à manutenção do ciclo viral^(1,2).

A manutenção dos arbovírus na natureza ocorre através de ciclos silvestres complexos com participação de espécies de vertebrados silvestres (aves, roedores, marsupiais, primatas, morcegos, répteis e outros) e artrópodes hematófagos (mosquitos, carrapatos, ácaros, simulídeos e tabanídeos), porém, podem passar despercebidos. O homem é hospedeiro acidental para a maioria das arboviroses e se infecta ao penetrar em áreas enzoóticas, com exceção apenas para o vírus do Dengue, em que é o hospedeiro principal. Por outro lado, mudanças ecológicas no habitat natural destes vírus levam a alterações em seus ciclos, podendo haver adaptação a novos reservatórios e, com isto, aumentar sua multiplicação e o risco da emergência^(1,3). Outro mecanismo para manutenção dos arbovírus nesses vetores é a transmissão transovariana, como ocorre com os vírus da Encefalite Japonesa, Febre Amarela e Dengue⁽⁴⁾, entretanto este modo de transmissão não é tão expressivo na disseminação dos arbovírus⁽⁵⁾.

No homem, após a picada de um vetor infectado, o vírus é transmitido para a corrente sanguínea. Após a infecção, há um período de incubação durante o qual ocorre multiplicação viral, e sua intensidade e a sua localização determinarão o aparecimento

de manifestações clínicas, como febre acompanhada de mal-estar, cefaléia, náuseas, vômitos e mialgia. Neste estágio, a doença pode terminar ou exibir manifestações hemorrágicas secundárias. De uma forma geral, infecções por arbovírus podem levar a quatro formas clínicas distintas, dentre as quais se destaca a doença febril (causada por praticamente todos os arbovírus patogênicos ao homem), doença febril com exantema, febre hemorrágica (no Brasil, causada apenas pelos vírus do Dengue e Febre Amarela) e encefalite (causada por diversos membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, e *Bunyaviridae*). No entanto, sintomatologia inespecífica pode ser observada nas infecções por diferentes arbovírus, especialmente na fase aguda, dificultando o estabelecimento de um provável agente etiológico pelo médico assistente^(2, 4, 6, 7).

Devido à grande extensão territorial (8.514.876 km²), com áreas tropicais, o Brasil possui regiões florestais situadas no Norte, Nordeste, Sudoeste e Sudeste, com grande diversidade de plantas e animais, apresentando condições ecológicas adequadas para a ocorrência de zoonoses causadas por arbovírus. O país apresenta aproximadamente 200 milhões de habitantes, onde a maioria vive em áreas urbanas infestadas por mosquitos vetores, dos gêneros *Aedes* e *Culex*, aumentando os riscos de ocorrência de surtos de infecções nas áreas urbanas densamente habitadas, devido ao grande número de pacientes virêmicos infectados em áreas silvestres de transmissão (www.ibge.com.br)^(1, 8).

1.2. Família Flaviviridae – Gênero *Flavivirus*

Em termos de saúde pública, os vírus pertencentes às famílias *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*) são responsáveis por aproximadamente 95% dos casos humanos causados por arbovírus no Brasil⁽⁹⁾. O gênero *Flavivirus* é composto por 53 vírus distribuídos mundialmente, sendo que 22 destes estão associados a doenças humanas, entre elas, o Dengue, Febre Amarela, West Nile e Encefalite Japonesa são as mais importantes no mundo por causar alta taxa de morbidade e mortalidade⁽¹⁰⁾.

No Brasil já foram isolados os *Flavivirus* da Febre Amarela (*Yellow Fever Virus* – YFV), do Dengue (DENV) 1, 2, 3 e 4, Encefalite de Saint Louis (*Saint Louis Encephalitis* - SLEV), Rocio (ROCV), Ilhéus (ILHV), Bussuquara (BSQV), Iguape (IGUV) e Cacipacoré (CPCV). Muitos destes vírus são zoonóticos no meio silvestre e podem, eventualmente, infectar o homem, como os vírus YFV, SLEV, ROCV, ILHV e BSQV⁽¹¹⁾.

Podemos destacar DENV, Febre Amarela (YFV), Encefalite de Saint Louis (SLEV), Rocio (ROCV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV), como os responsáveis pela maioria dos casos humanos causados por arbovírus no Brasil⁽¹²⁾. Estes vírus podem produzir surtos epidêmicos esporádicos ou epidemias de grandes proporções^(1, 4, 13, 14).

A maioria dos arbovirus são zoonoses transmitidas por mosquitos causando doenças em humanos e animais onde o principal vetor é o mosquito *Culex* e hospedeiros vertebrados naturais são pássaros silvestres⁽¹⁵⁾.

1.3. Estrutura, Genoma e Replicação do gênero *Flavivirus*

A estrutura viral apresenta *virion* com diâmetro aproximado de 40-60nm, com capsídeo de simetria icosaédrica, circundado por envoltório de natureza lipoprotéica, originário da célula hospedeira, contendo projeções superficiais⁽¹⁶⁾ (Figura 1).

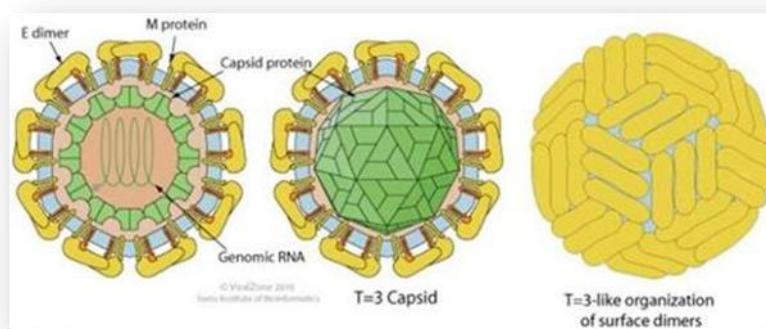


Figura 1: Estrutura esquemática dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*. Representação do nucleocapsídeo icosaédrico circundando o RNA viral. Os vírus apresentam um envelope derivado da membrana de células hospedeiras, além de glicoproteínas E, uma proteína membrana M, rearranjada como homodímero e associada a E. **Fonte:** <http://www.expasy.org>

O genoma é constituído por RNA de fita simples não segmentado, linear, de polaridade positiva, com aproximadamente 11000 nucleotídeos. Possui uma única fase aberta de leitura, a qual leva à formação de um único polipeptídeo, que é processado por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (proteínas do core – C, da membrana – M e a glicoproteína de superfície – E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5)⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. A ORF é flanqueada por duas regiões não-codificadoras (NCR- *Noncoding Region*) a 3'NCR e a 5'NCR, a qual apresenta CAP. As regiões não-codificadoras são importantes para a regulação e expressão das proteínas virais^(17, 20, 21) (Figura 2).

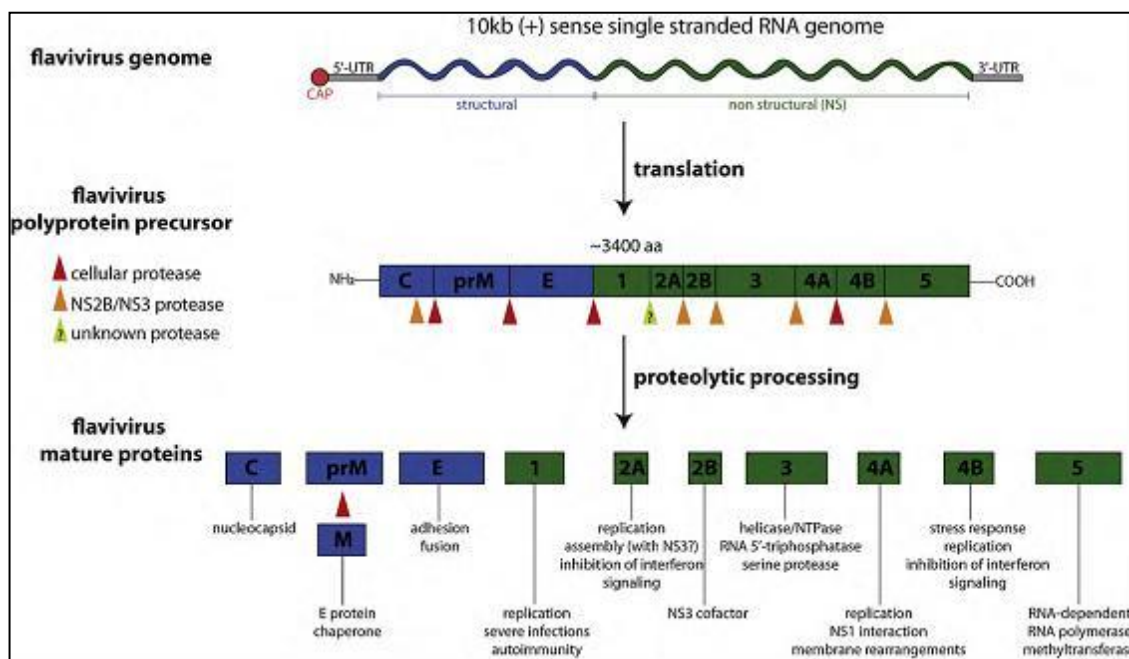


Figura 2: Organização genômica do gênero *Flavivirus*. Uma única fase de leitura (ORF) codifica uma poliproteína precursora que é processada em 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5). Fonte: Pastorino et al, 2010⁽²²⁾.

As funções de todas as proteínas virais ainda não foram totalmente estabelecidas, sabe-se que as proteínas estruturais são incorporadas ao *virion* durante a maturação e liberação viral e as proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação nas células infectadas⁽²³⁾.

A proteína E é responsável pela ligação do vírus na célula, bem como pela fusão com a membrana endossomal, sendo o maior determinante antigênico viral^(20, 24). A proteína C forma o nucleocapsídeo viral e está envolvida no transporte da proteína prM (precursora da proteína M) ao retículo endoplasmático para ser glicosilada^(20, 24). A proteína M é formada a partir do processamento de sua precursora prM, sendo uma proteína de membrana de partículas virais maduras^(20, 24).

A proteína NS1, embora com função desconhecida, participa de forma essencial na replicação do RNA viral, pois estudos de mutagêneses em NS1 causaram diminuição

drástica na replicação do RNA e produção viral^(24, 25). A NS2a participa na replicação viral e pode estar associada à inibição de *Interferon*⁽²⁶⁾. NS2b forma um complexo estável com a proteína NS3, agindo como um co-fator para a atividade serino-protease^(24, 27). A proteína NS3 é altamente conservada entre os flavivirus. É uma proteína multifuncional, pois tem atividade de serino-protease na sua porção aminoterminal, é uma RNA-helicase RNA-dependente, além disso, codifica uma atividade de RNA trifosfatase com o propósito de defosforilar a região 5' terminal do genoma do RNA antes da adição da CAP⁽²⁴⁾. As proteínas NS4a e b são hidrofóbicas, associadas à membrana e pouco conservadas entre os flavivirus. Acredita-se que são componentes da replicase por formarem complexos com NS2b e NS3^(20, 21, 24). A proteína NS5 é a maior das proteínas virais e altamente conservada entre os *Flavivirus*. Apresenta atividade de RNA polimerase RNA-dependente na região carboxi-terminal e metiltransferase em sua porção aminoterminal^(20, 21, 24, 28).

Em geral, a replicação flaviviral ocorre dentro do citoplasma de células susceptíveis ao vírus (Figura 3). O ciclo inicia-se com a ligação da proteína E a receptores celulares específicos (possivelmente, glicosaminoglicanos sulfatados e heparan sulfato), com a subsequente entrada do vírus por endocitose. Após a fusão do vírion à membrana da célula hospedeira, o nucleocapsídeo é entregue ao citoplasma e os endossomos que contém as partículas virais fundem-se com os lisossomos, levando a uma diminuição do pH intra-endossômico, potencializando mudanças conformacionais na proteína E, a qual resulta na fusão do envelope viral a membrana das vesículas endossomais e, conseqüentemente, a desmontagem da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma, local onde ocorre a tradução do RNA genômico^(20, 24, 29, 30).

Todas as proteínas virais conhecidas são produzidas a partir de um precursor da poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos, a qual é processada por uma combinação de proteases virais e celulares originando proteínas estruturais, localizadas na extremidade amino-terminal da poliproteína, e proteínas não-estruturais que ocupam a extensão restante. Sequências características de uma serino-protease, uma RNA helicase e de uma RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) são encontradas em pontos similares nas poliproteínas dos três gêneros virais da família *Flaviviridae*. Os componentes enzimáticos da RNA replicase são provavelmente formados a partir dos produtos de segmentação contendo essas regiões^(31, 32).

A replicação do RNA acontece em complexos de replicação citoplasmáticos associados a membranas perinucleares, a partir da síntese de um RNA intermediário de polaridade negativa (ssRNA⁻), que serve para a formação de uma fita dupla de RNA (dsRNA), o qual é usado como molde para a síntese dos RNAs (ssRNA⁺) da progênie. A montagem do vírus ocorre em associação a membranas do retículo endoplasmático intracelulares com formação do nucleocapsídeo pela proteína C e ssRNA⁺ que se ligam a porção citoplasmática das glicoproteínas virais ancoradas na membrana bilipídica do retículo endoplasmático, os quais contém heterodímeros das proteínas prM e E^(32, 33).

A maturação viral ocorre na via secretora do Complexo de Golgi dentro de vesículas citoplasmáticas, as quais se fundem com a membrana plasmática, liberando as novas partículas virais para o compartimento extracélular por via exocítica^(29, 34).

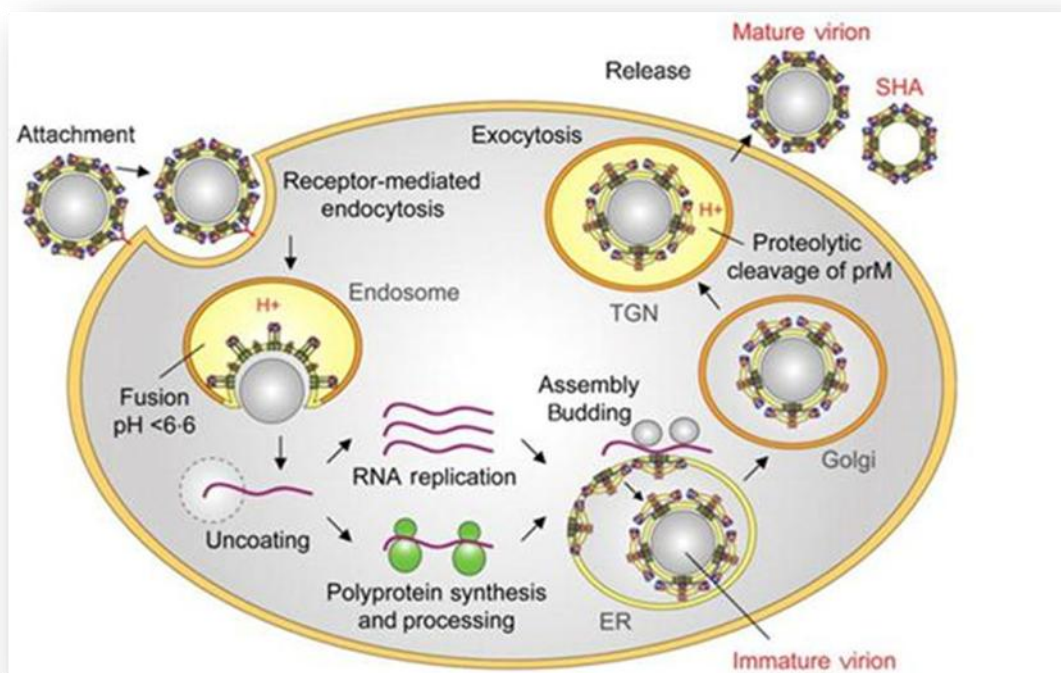


Figura 3: Ciclo de replicação viral de gênero *Flavivirus*. Vírus do gênero *Flavivirus* são internalizados por endocitose e ocorre a liberação do material genético no citoplasma da célula do hospedeiro. A tradução do RNA viral é seguida pelo processamento da poliproteína e, logo após, forma-se o complexo de replicação viral. A maturação da partícula viral ocorre na via do Complexo de Golgi e os vírus são liberados por exocitose. **Fonte:** Stiasny e Heinz, 2006⁽³⁵⁾

Dessa forma, a replicação do RNA viral envolve não apenas proteínas virais, mas também proteínas celulares oriundas da maquinaria de transcrição e tradução celular. Estas proteínas celulares interagem com proteínas virais não-estruturais, entre elas NS2B, NS3 e NS5 e com a região 3'NCR do genoma viral para formar o complexo de replicação viral (replicase viral). Os componentes deste complexo de replicação, especialmente os fatores celulares, ainda são pouco conhecidos, portanto trabalhos envolvendo a identificação destes fatores seriam de grande valia para o melhor entendimento da replicação dos flavivirus^(15, 33).

1.4. Febre Amarela

A Febre Amarela é uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública⁽²¹⁾.

Essa doença é causada pelo vírus da Febre Amarela (YFV-*Yellow Fever Virus*), o protótipo do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). O YFV está incluído nos arbovírus, os quais são transmitidos a vertebrados através da picada de artrópodes⁽²³⁾.

No Brasil, a Febre Amarela divide-se em duas formas epidemiológicas, silvestre e urbana, que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados. O YFV é mantido em ciclo silvestre caracterizado por epizootias entre as espécies de primatas não-humanos, sendo considerados os principais hospedeiros vertebrados, e o mosquito do gênero *Haemagogus*, em particular *Haemagogus janthinomys*, o principal transmissor. No ciclo urbano, como ocorre com o Dengue, o vírus é transmitido diretamente ao homem pelo mosquito *Aedes aegypti*^(17, 21, 23, 36).

Clinicamente, a infecção pelo YFV pode ser assintomática ou causar sintomas caracterizados por febre alta, mal estar, dor de cabeça, dor muscular, cansaço e calafrios. Após três ou quatro dias, a maioria dos doentes (85%) recupera-se completamente e fica permanentemente imunizado contra a doença. Cerca de 15% dos doentes infectados com Febre Amarela apresentam sintomas graves como febre hemorrágica cursando com falência hepática, insuficiência renal e morte em aproximadamente 50% dos casos^(17, 21).

No Brasil, os primeiros relatos de epidemia de Febre Amarela ocorreram em Recife e Salvador nos anos de 1685 e 1686. No século XVIII não há relato de epidemias

da doença no país. No entanto, em 1849 foi registrada na Bahia uma nova epidemia, a qual se disseminou por 16 províncias brasileiras, incluindo Goiás, Mato Grosso e a cidade do Rio de Janeiro cuja incidência de infecção foi de 35%⁽³⁷⁾. No fim do século XIX foi identificado o mosquito transmissor da doença, o que permitiu adotar em vários países medidas de erradicação⁽³⁸⁾. Com o melhoramento da infra-estrutura urbana, nas primeiras décadas do século XX, aliado às medidas de combate ao vetor e ao advento da vacina antiamarílica, em 1937, o número de casos de Febre Amarela foi rapidamente reduzido. Desta forma, os últimos casos registrados da doença urbana no Brasil ocorreram em 1942 (Ministério da Saúde, 1969) e em 1991, nas Américas^(23, 39).

Os casos silvestres da doença são notificados anualmente, principalmente nas regiões Amazônica, do Planalto Central e do Pantanal brasileiro, onde foram registrados, nos anos de 2003 a 2006, 71 casos, com letalidade de 60% entre 2003 e 2004 e 100% nos anos seguintes. Entre dezembro de 2007 a Janeiro de 2008, foram registrados 20 casos de Febre Amarela silvestre nas regiões dos Estados de Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso, com letalidade de 50% (Ministério da Saúde, Janeiro de 2008)⁽⁴⁰⁾.

A re-emergência da Febre Amarela silvestre no Brasil tem ocorrido simultaneamente com o aumento da distribuição e densidade populacional do vetor urbano *Ae. aegypti* pelas regiões do país. A migração de indivíduos infectados, em fase de viremia, do meio silvestre para cidades com alta densidade do vetor, pode iniciar epidemias urbanas explosivas e acometer milhares de pessoas entre a população não vacinada^(8, 41).

A vacinação é a mais importante medida de controle. A vacina é produzida a partir do vírus atenuado, cepa 17DD, em ovos embrionados de galinha apresentando

sacarose, glutamato, sorbitol, gelatina bovina, eritromicina e hanamicina na sua composição final (Fundação Oswaldo Cruz – Bio-Manguinhos), Apesar da segurança e eficiência da vacina, o vírus continua a ser um problema de saúde pública nas áreas tropicais da América do Sul (<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/index.php>).

Indivíduos imunocomprometidos apresentam risco de desenvolver complicações após a aplicação da vacina, indivíduos sensíveis a proteína do ovo, eritromicina e gelatina também não podem ser imunizados⁽³⁸⁾. O tratamento desta doença é voltado para o combate dos sintomas clínicos, não havendo um medicamento específico contra o vírus. Sendo assim, estudos de fármacos antivirais tornam-se de extrema importância para o combate desta patologia.

1.5. Encefalite de Saint Louis

A Encefalite de Saint Louis é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo vírus SLE e encontra-se amplamente distribuído nas Américas, desde o Canadá até a Argentina^(10, 42, 43). Ao contrário do que acontece nos Estados Unidos, que apresenta caráter endêmico, sendo responsável por surtos que acometem 5000 pessoas, desde 1955^(44, 45), em países da América Central e do Sul, a detecção do SLEV é rara⁽⁴²⁾, embora 5% da população do norte e sudeste do Brasil apresentam anticorpos contra o vírus. Entretanto, esses dados devem ser criteriosamente analisados, pois pode haver reação cruzada entre anticorpos de diferentes flavivirus, os quais são induzidos principalmente por vacinação contra Febre Amarela ou exposições aos vírus DENV. No entanto, o SLEV pode estar circulando nestas áreas e causando infecções humanas, embora a maioria delas não seja diagnosticada⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

No Brasil, os primeiros casos registrados da doença em humanos ocorreram nos anos de 1971 e 1978, nos quais os pacientes apresentavam sinais de icterícia e doença febril sem sintomas neurológicos^(46, 47, 49). Em 2004, o vírus foi isolado de uma moradora de São Pedro (SP), a qual apresentava doença febril semelhante à causada pelo Dengue⁽⁵⁰⁾.

No início de 2005, a Argentina registrou uma epidemia causada por SLEV, na cidade de Córdoba, com 65,3% de pacientes positivos⁽⁵¹⁾. Concomitante a esta epidemia, foi realizado um estudo com aves domésticas (gansos e galinhas) das áreas urbanas próximas às residências de pacientes positivos para SLEV. Destas aves, 62% foram positivas⁽⁵²⁾.

Em maio de 2005, a presença de anticorpos contra SLEV foi investigada em aves silvestres (residentes e migratórias) capturadas em Iguape, SP, porém a prevalência não foi significativa epidemiologicamente. No entanto, em aves capturadas em maio de 2006, houve uma alta prevalência de anticorpos anti-SLEV. Os autores concluem que pode ter ocorrido uma importante transmissão de SLEV na região devido, provavelmente, à re-introdução do vírus ou à ativação do ciclo silencioso de transmissão por algum fator do meio⁽⁵³⁾.

A emergência do SLEV passou a ser um fato preocupante no Brasil a partir da constatação do primeiro surto no país. Em 2006, no município de São José do Rio Preto/SP, concomitante a uma epidemia de DENV-3 que atingiu cerca de 15000 pessoas, foram registrados 12 casos e um de co-infecção com DENV-3, nos quais os pacientes apresentavam sintomas de Dengue Hemorrágico e encefalite. Como o dengue é uma doença disseminada no Brasil, a alta prevalência de anticorpos anti-SLEV sugere

que a infecção pelo vírus não é diagnosticada corretamente e sua importância é subestimada^(54, 55).

Dados sorológicos indicam a presença de anticorpos específicos circulantes na população localizada próximo às áreas florestais da Amazônia e Mata Atlântica, e apesar do raro isolamento do SLEV de humanos, este vírus tem sido isolado de artrópodes, aves e animais silvestres, indicando que é enzoótico nestas regiões^(43, 56, 57).

Infecções por SLEV podem ser assintomáticas ou subclínicas, mas também podem levar a sintomas semelhantes a um resfriado comum e muitas vezes são diagnosticadas como Dengue. Possivelmente uma pequena quantidade das infecções por SLEV é clinicamente aparente. Os principais sinais e sintomas observados incluem febre, cefaléia, mialgia, náuseas/vômitos e sonolência. Normalmente, quadro grave com sinais neurológicos focais e encefalite ocorre em pacientes com mais de 60 anos ou imunodeprimidos, para os quais a letalidade varia de 7 a 24%^(58, 59). Entretanto, pela reatividade cruzada de anticorpo entre diferentes flaviviruses, imunização pelo vírus Dengue também confere imunização contra o SLEV⁽¹⁰⁾.

O vírus é mantido na natureza em ciclos enzoóticos envolvendo pássaros migratórios, primatas, preguiças, tatus, marsupiais e, os principais vetores, *Culex spp.* O homem é infectado por mosquitos que se alimentaram em pássaros virêmicos e são os hospedeiros acidentais⁽⁶⁰⁾.

A sorologia é o método mais comumente utilizado para o diagnóstico de SLEV, mas a reatividade cruzada pode levar a erros de interpretação dos resultados^(61, 62). Sendo assim, métodos moleculares têm sido utilizados para diminuir a chance de erros de diagnóstico, uma vez que tais testes são específicos para SLEV^(62, 63).

Não existe tratamento específico para SLEV, somente tratamento de suporte para ajudar a aliviar os sintomas e prevenir complicações⁽¹⁵⁾. O Brasil não possui programa de vigilância epidemiológica para este vírus e os profissionais da saúde não estão familiarizados com seu diagnóstico. Sendo assim, estudos de antivirais específicos para SLEV são necessários para a tentativa de uma nova abordagem para a prevenção da replicação viral deste vírus⁽³¹⁾.

1.6. Relevância e Justificativa

Um tema comum entre todos os flavivirus é que praticamente não existe nenhuma terapia antiviral específica para o tratamento de doenças em humanos. Apesar de vacinas licenciadas para a prevenção de alguns destes vírus (YFV, Vírus da Encefalite Japonesa – JEV), ainda existe uma elevada prevalência de infecções causadas por eles, provavelmente devido à subutilização de vacinas em áreas endêmicas. Isto é altamente preocupante uma vez que a maior parte dos vírus de RNA são emergentes e altamente patogênicos⁽⁶⁴⁾.

Entretanto, estudos para desenvolver terapias antivirais eficazes têm sido realizados somente para alguns vírus pertencentes a esta família, tal como o Vírus da Hepatite C⁽⁶⁵⁾ e não há interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos contra outros flavivirus, tais como o protótipo do gênero, YFV e SLEV⁽⁶⁶⁾.

Atualmente, existem cerca de 50 fármacos antivirais licenciados, onde metade é recomendada para o tratamento de infecções do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Algumas estruturas sintéticas aprovadas para o tratamento de vírus de RNA, como a Ribavarina (1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida), têm sido testadas contra Febre Amarela. Esta estrutura é um nucleosídeo de purina com largo

espectro de atividade contra vírus de DNA e RNA⁽⁶⁷⁾. Este composto exerce um efeito protetor *in vitro* da maioria dos vírus de RNA testados embora sua potência possa variar consideravelmente dependendo da natureza do vírus⁽⁶⁸⁾. Um screening computacional realizado na biblioteca do Instituto Nacional de Câncer identificou recentemente um pequeno conjunto de compostos que foram detectados para se ligarem na proteína E de flavivirus. Todos os compostos foram avaliados em ensaios de inibição do vírus da Febre Amarela e, embora os compostos ativos tenham estruturas variáveis, a maior parte das moléculas apresenta um anel de tiazole central como característica comum⁽⁶⁹⁾. Entretanto, mesmo após este estudo, até o presente momento não existem agentes antivirais clinicamente úteis.

O sistema de interferência de RNA é uma ferramenta que foi descrita em inúmeros trabalhos avaliando os efeitos da iRNA no ciclo replicativo de vários vírus patogênicos, dentre eles, vírus da Influenza⁽⁷⁰⁾, HIV^(71, 72), Vírus da Hepatite B e C⁽⁷³⁻⁷⁵⁾, Poliovírus⁽⁷⁶⁾, Paramixovírus⁽⁷⁷⁾, Coronavírus associado à Síndrome Respiratória Aguda⁽⁷⁸⁾, Papilomavírus Humano⁽⁷⁹⁾, Vírus Sincicial Respiratório^(77, 80), Febre Aftosa⁽⁸¹⁾ e Herpes Simples Tipo 1⁽⁸²⁾. Nestes trabalhos foi demonstrada a capacidade da iRNA em inibir *in vitro* e/ou *in vivo* a replicação viral⁽⁷⁾.

Anteriormente, foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Virologia - FAMERP, um sistema de interferência de RNA (iRNA) contra o YFV para estabelecer a possibilidade de desenvolver potentes drogas antivirais. Neste projeto, a inibição da replicação do vírus da Febre Amarela pela iRNA foi demonstrada através de ensaios *in vitro* utilizando células expressando siRNA constitutivamente e pela inoculação em camundongos adultos e neonatos. Porém, existe a necessidade de maiores elucidações

referente ao mecanismo de interferência de RNA no biosistema celular e no sistema de inoculação dos siRNAs *in vivo*⁽⁴⁰⁾.

Algumas classes de compostos demonstram grande atividade biológica⁽⁸³⁾, sabe-se que tiossemicarbazonas, ftalimididas e tiazoles têm posição de destaque em um grande numero de subunidades estruturais utilizados para amplo espectro de atividades, sendo que o modo de ação destes fármacos é geralmente atribuído a inibição de múltiplos alvos. Como por exemplo, derivados de thiosemicarbazones que apresentaram atividades antimicrobianas, anticonvulsivas, antiinflamatórias, entre outros⁽⁸⁴⁻⁸⁹⁾, além de inibidores do vírus da Leucemia de Moloney, HIV, Vírus Herpes Simplex (HSV) e Varíola⁽⁹⁰⁾. Sendo assim, a descoberta de novas drogas antivirais potentes e seguras para o tratamento ou profilaxia de infecções causadas por flavivirus é de suma importância. A utilização de moléculas sintéticas com estruturas que apresentem como grupo comum núcleos de thiosemicarbazone ou phthalyl-tiazol podem ser potentes inibidores da replicação de flavivirus, uma vez que a atividade antiviral já foi apresentada para outras famílias virais.

O desenvolvimento de drogas contra infecções pelo YFV e SLEV seria de grande valia para a saúde pública por trazer grandes avanços na prevenção e tratamento das enfermidades. Sendo assim, a busca de novas moléculas que inibam a replicação viral é extremamente importante, devido ao fato de até o presente momento não existir moléculas eficazes contra tais vírus.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar possíveis antivirais contra os arbovírus causadores de doença febril aguda e encefalites – Yellow Fever Virus e Saint Louis Encephalitis Virus

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a capacidade de inibição da replicação viral dos compostos *in vitro* através das técnicas de Ensaio de Redução de Placas, Imunofluorescência, Viabilidade Celular e Citometria de Fluxo.
- b) Avaliar a capacidade de inibição da replicação viral dos compostos *in vivo* em camundongos ABR (nocautes para receptores de *Interferon α* e β)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Culturas Célulares

No presente estudo foram utilizadas células C6/36, clones celulares de larvas de *A. albopictus*, para a preparação do estoque viral, mantidos em Meio Leibovitz (L15 - acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino – SFB - 100U/mL de Penicilina e 100µg/mL de Estreptomicina) e células Vero E6 (Células diplóide de rim de Macaco Verde Africano, clone E6), gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (USP – Ribeirão Preto), mantidas em Meio Eagle's Minimum Essential (MEM - acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino – SFB - 100U/mL de Penicilina e 100µg/mL de Estreptomicina), à temperatura de 37°C com 5% de CO₂, para a realização dos experimentos.

3.2. Produção Viral

Estoques virais preparados a partir da cepa vacinal YF17DD (Biomanguinhos, FIOCRUZ) e SLEV (cepa BeAr417704, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Tadeu Figueiredo, USP), foram propagados em linhagem celular C6/36, segundo metodologia descrita por Figueiredo (1990)⁽⁹¹⁾.

Para tanto, monocamadas celulares, com aproximadamente 90% de confluência, foram infectadas com YFV ou SLEV por 1 hora a 28°C e incubadas por 7 dias com meio de manutenção (L15 - acrescido de 1% de Soro Fetal Bovino – SFB - 100U/mL de Penicilina e 100µg/mL de Estreptomicina). Após período de incubação, os sobrenadantes foram aliquotados e congelados a -80°C. Logo após, foi realizada a confirmação da presença do genoma viral por RT-PCR, segundo metodologia empregada por Bronzoni e colaboradores⁽⁶³⁾.

3.3. Titulação Viral

A titulação viral foi realizada através do Ensaio de Placas de lise, o qual utiliza meio semi-sólido e evita formação de placas secundárias, infectando somente as células adjacentes e assegurando que cada placa formada no teste seja proveniente de uma partícula viral infecciosa do inoculo inicial^(92, 93).

Para tanto, diluições seriadas de razão 10 (10^{-2} a 10^{-6}) da suspensão de YFV e SLEV proveniente de cultura celular foram inoculadas em células e aderidas em microplacas de 24 cavidades. Cada diluição, incluindo o controle negativo (sem vírus), foi inoculada em quadruplicata. Uma hora após a incubação, o inoculo viral foi removido para adição de 1mL/cavidade da mistura (v/v) de Carboximetilcelulose (CMC) 2% e meio de manutenção concentrado 2X. As células foram incubadas a 37°C, 5%CO₂ e observadas diariamente. Após seis dias, a mistura foi removida para fixação das células vivas com solução de Paraformaldeído a 4%. Solução de Cristal Violeta a 1% foi adicionada para visualização e contagem das placas. Por fim, foi calculado o título de infectividade expresso pelo número de unidades formadoras de placas e, portanto, de partículas virais, já que cada placa formada é iniciada pela infecção de uma partícula viral infectante.

3.4. Síntese dos Compostos

2-(3-chlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (WP36), 2-(2,3-dichlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (WP33), 2-(3,4-dichlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (WP 24), 2-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)isoindoline-1,3-dione (SC-43) e 2-(4-(4-chlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)isoindoline-1,3-dione (3g) (SC-47) foram obtidos a partir de síntese

realizada no Laboratório de Planejamento e Medicina Química, Universidade Federal do Pernambuco, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite, os quais foram devidamente identificados por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, infravermelhos e por Espectrometria de Massa.

Em seguida, os compostos foram reconstituídos com DMSO (Sigma) em concentração final de 100µg/µL para posteriores análises.

3.5. Avaliação da Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em células Vero E6. Para tanto, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma–Aldrich, Germany), proposto por Mosmann (1983)⁽⁹⁴⁾ com algumas modificações.

Monocamadas de células Vero E6 aderidas em microplaca de 96 cavidades foram expostas a diferentes concentrações dos compostos por sete dias à temperatura de 37°C com 5% de CO₂. Após incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido para a adição de 100µL de meio Mem acrescido de MTT (1 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante 30 minutos. Após este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 100µL de DMSO (Merck) para a solubilização dos cristais formazan. A placa foi agitada por 10 minutos e realizada a leitura no espectrofotômetro a LT-4000 Microplatereader (LabTech) a 540nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular. A concentração necessária de cada composto para reduzir a 50% da viabilidade celular (CC₅₀) foi calculada a partir da comparação de células não tratadas⁽⁹⁵⁾.

3.6. Ensaio de Redução de Placas

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia proposta por Lennette⁽⁹⁶⁾ com algumas modificações. Monocamada de células Vero E6, aderidas em microplacas de seis cavidades, foram inoculadas com 50 PFUs/cavidade de suspensão de YFV ou SLEV (o experimento foi realizado em triplicata). Após uma hora de infecção, o inoculo foi substituído por 4mL de mistura contendo, MEM com 1% CMC contendo 5µg/mL dos compostos, separadamente. As células foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂, durante seis dias e, em seguida, fixadas e coradas de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 3.3. Por fim, foi calculada a média e o desvio padrão do número de placas obtidas para cada grupo de células tratadas ou não-tratadas, bem como foi determinada a porcentagem de inibição da replicação viral.

3.7. Eficiência da inibição da replicação viral em células tratadas segundo imunofluorescência

Monocamadas celulares (70-80% confluência) aderidas em lamínulas em placa de 24 cavidades foram inoculadas com 10 MOI de YFV ou SLEV por uma hora. Após período de infecção, o inóculo foi substituído por meio de manutenção com 5µg/mL dos compostos e incubados por 24 horas a 37°C, com 5% CO₂. Após esta incubação, as células foram fixadas com solução de Paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS: 37 mM NaCl, 10 mM Fosfato, 2.7 mM KCl, pH 7.4), por 20 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 0,05% em PBS, por 30 minutos e bloqueadas com solução de bloqueio (soro de cabra a 10% em PBS), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se anticorpo de coelho anti-NS4 de YFV, gentilmente cedido pelo Dr. Charles Rice (Rockefeller University) ou MIAF-SLEV

(gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Tadeu de Moraes Figueiredo, USP) na diluição de 1:1000 em solução de bloqueio. Após incubação a 4°C, em câmara úmida, por 16 horas, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com PBS, para eliminar o excesso de reagentes. Após lavagens, as células foram submetidas à incubação com anticorpos secundários (AlexaFluor 488 Goat Anti-rabbit IgG para YFV ou AlexaFluor 488 Goat Anti-mouse IgG para SLEV, Molecular Probes, USA) na diluição de 1:2000 a 37°C, em câmara úmida, por uma hora, seguido de três lavagens de cinco minutos com PBS. Por fim, as lamínulas foram retiradas das cavidades e colocadas sobre lâminas contendo 10µL de solução de Mowiol 5% em Glicerol 12% para serem analisadas em Microscópio de Fluorescência (BX 41 equipado com câmera Q-Color5, Olympus).

3.8. Análise do efeito antiviral pela viabilidade celular

Três tipos de tratamentos foram realizados neste ensaio, tratamento das células com os compostos e posterior infecção com YFV ou SLEV (Pré-tratamento), Tratamento das células com os compostos após infecção com YFV ou SLEV (Pós-tratamento) e avaliação do efeito dos compostos na Adsorção Viral⁽⁹⁵⁾.

3.8.1. Pré-tratamento

Monocamadas de células Vero E6 aderidas em microplaca de 96 cavidades foram cultivadas durante 24 horas utilizando meio MEM suplementado com 10% de SFB e 5µg/mL dos compostos. Após período de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram desafiadas com 1 MOI de YFV ou SLEV. Após período de infecção, o inoculo foi removido e adicionado meio MEM acrescido de 1% SFB e 5µg/mL dos compostos. As células foram então incubadas por 48h para infecção com

YFV e 72h para infecção com SLEV, a 37°C, com 5% CO₂. Passado este período, foi realizado o ensaio de MTT citado no item 3.5 para a análise da viabilidade celular, uma vez que o MTT é incorporado pelas mitocôndrias de células viáveis, é possível comparar a viabilidade celular comparando-se com o grupo controle – sem infecção⁽⁹⁵⁾.

3.8.2. Pós-Tratamento

Monocamadas celulares foram cultivadas em placas de 96 cavidades e incubadas por 24 horas em meio umidificado a 37°C e 5% CO₂. Logo após, as células foram desafiadas com 1 MOI de YFV ou SLEV por uma hora. Em seguida, o inóculo foi cuidadosamente removido e foi substituído por meio MEM acrescido de 1% de SFB e 5µg/mL dos compostos. As células foram novamente incubadas em meio umidificado a 37°C e 5% CO₂ durante 48h para infecção com YFV e 72h para infecção com SLEV e seguiu-se o ensaio de MTT descrito no item 3.5.

3.8.3. Avaliação do efeito simultâneo dos compostos na infecção viral

Células Vero E6 foram cultivadas em placas de 96 cavidades conforme descrito acima. Após 24 horas, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 1 MOI de YFV ou SLEV concomitantemente com 5µg/mL dos compostos para a análise do efeito dos compostos na adsorção viral. Após período de infecção, o inóculo foi removido e substituído por meio MEM acrescido de 1% de SFB e 5µg/mL dos mesmos compostos. As células foram novamente incubadas em meio umidificado a 37°C e 5% CO₂ durante 48h para infecção com YFV e 72h para infecção com SLEV e seguiu-se o ensaio de MTT descrito no item 3.5.

3.9. Análise da Inibição da Replicação Viral de células tratadas através da Citometria de Fluxo

Monocamadas de células (70-80%) aderidas em microplacas de 6 cavidades foram desafiadas com 1 MOI de YFV ou SLEV. Após período de infecção, o inoculo foi substituído por meio MEM acrescido de 5µg/mL de cada composto e incubado por 24 ou 48 horas a 37°C, com 5% CO₂.

Após período de incubação, as células foram tripsinizadas, transferidas para microplacas de 96 cavidades e lavadas com tampão de lavagem (PBS1X, 0,5% BSA). Após lavagem, as células foram centrifugadas a 420G, 4°C, por 10 minutos e permeabilizadas com Tampão de Permeabilização (PBS1X, 0,5% BSA, 0,1% Saponina) por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se o anticorpo primário específico para YFV ou SLEV (Anti-NS4BYFV e MIAF-SLEV, respectivamente), na diluição 1:200 e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz a temperatura ambiente. Após período de incubação, as células foram novamente lavadas para a retirada de excesso de reagentes e foram adicionados os anticorpos secundários (AlexaFluor 488 Goat Anti-rabbit IgG para YFV ou AlexaFluor 488 Goat Anti-mouse IgG para SLEV, Molecular Probes, USA) na diluição de 1:200 por 30 minutos ao abrigo da luz a temperatura ambiente, seguida três lavagens com tampão lavagem. Logo após, as células foram fixadas com tampão de Formaldeído a 4% (PBS1X, 4% Formaldeído). e submetidas à citometria de fluxo no aparelho BD FACS Calibur (BD Biosciences). Posteriormente, foram analisadas pelo software FlowJo (TreeStar, Inc., Ashland, OR) para a geração de gráficos de comparação.

3.10. Teste de infecção em camundongos nocautes para receptores de *Interferon* α e β (ABR)

A falta de modelos animais para o estudo de uma infecção que mimetize o que acontece em humanos é uma das grandes dificuldades encontradas para estudar a patogenia de *Flavivirus*. Sendo assim, a busca por um modelo foi necessária em nosso estudo para a realização dos testes *in vivo*.

3.10.1. Camundongos

No estudo, foram utilizados camundongos SV129 (selvagens), provenientes do Bioterio da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e deficientes para receptores de *Interferon* α e β – ABR, com idade média de 3 semanas, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Mauro Teixeira (UFMG). Protocolo Comitê de ética Animal – CETEA UFMG 133/2009.

3.10.2. Infecção dos camundongos e processamento das amostras

Grupos de animais foram inoculados via subcutânea com 10^3 ou 10^5 PFU de YFV17D. Os camundongos controles foram inoculados com meio de cultura. Seis dias após a inoculação, os camundongos foram sacrificados para a obtenção de amostras de sangue, cérebro, fígado e baço para posteriores ensaios.

3.10.3. Ensaios laboratoriais

Para análise laboratorial, os ensaios realizados foram Hematócrito, Fosfatase Alcalina, Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT). Tais

ensaios foram realizados no Laboratório Central do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

3.10.4. Análise histopatológica do fígado dos camundongos inoculados com YFV

Os animais infectados ou não com YFV foram observados durante 6 dias e logo após, sacrificados. O fígado de cada animal foi retirado e armazenado em solução de Formol a 10% e em seguida embebidos em parafina para o corte histológico. As amostras teciduais foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas, por microscopia óptica, para a presença de lesões características de infecção viral.

3.10.5. Titulação Viral

As amostras biológicas recolhidas foram maceradas com meio MEM na proporção de 10% (p/v), centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, recolhido o sobrenadante para seguir a titulação conforme item 3.3.

3.10.6. PCR em Tempo Real (qPCR) para a avaliação da replicação de YFV.

Os fígados dos animais foram macerados com meio MEM para a extração do RNA viral. Para a extração do material genético foi utilizado 140 µl do macerado e o reagente TRizol (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, 5 µl do RNA extraído foi adicionado à reação de SuperScript®III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Um total de 25 µL da reação contendo 0,5 µL de SuperScript III RT Platinum Taq Mix, 1 µL de cada *primer* NS5YFSEQ1663F (5'-TTGAACTACATGAGCCCACATC-3') e NS5YFSEQ1828R (5'-CATAAGTCACTACCTGCCCG-3') a 10µM cada, 12,5 µL da mistura 2X SYBR

Green, 0,5 μL de ROX para uma concentração final de 500 nM e água suficiente para completar 25 μl , foi submetida a 50°C por 20 min e 95°C por 5 min, seguida de 40 ciclos: 95°C por 3 seg, 60°C por 30 seg, 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Finalmente, a curva de *melting* foi construída incubando os *amplicons* a 95°C por 15 seg. Os dados gerados foram plotados e analisados pelo programa GraphPad Prism 5.0.

As reações foram realizadas em StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystem). A curva padrão foi realizada com a amostra vacinal de YFV 17DD contendo 10^6 , 10^4 e 10^2 PFU/mL.

3.10.7. Ensaio de Neutralização

Monocamadas de células Vero E6 aderidas em microplacas de 96 cavidades foram preparadas 24 horas antes da realização do ensaio de neutralização. O ensaio de neutralização foi realizado com os soros colhidos dos animais infectados ou não com YFV. Primeiramente, os soros foram inativados a 56°C durante 30 minutos, logo após, foi realizada diluição seriada na base 2 das amostras biológicas em meio MEM, iniciando a partir da diluição 1:2 até a diluição 1:2048, e desafiadas com 100 TCID₅₀ de YFV por diluição, titulado anteriormente pelo método de Reed & Muench, 1938 (97). A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C e depois transferida para a microplaca preparada com a monocamada celular, neste ponto, as partículas virais que não foram neutralizadas irão infectar a monocamada celular. A placa foi então incubada a 37°C, com 5% CO₂ durante 7 dias. Após período de incubação, foi realizada a fixação e coloração das células conforme item 3.3 para a verificação do efeito citopático (morte celular) nas cavidades e posterior análise.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Síntese dos Compostos

2-(3-chlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (WP36), 2-(2,3-dichlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (WP33), 2-(3,4-dichlorophenoxy)acetaldehyde thiosemicarbazone (WP 24), 2-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)isoindoline-1,3-dione (SC-43) e 2-(4-(4-chlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)isoindoline-1,3-dione (3g) (SC-47) foram obtidos a partir de síntese realizada no Laboratório de Planejamento e Medicina Química, Universidade Federal do Pernambuco. As estruturas das moléculas estão ilustradas na Figura 4.

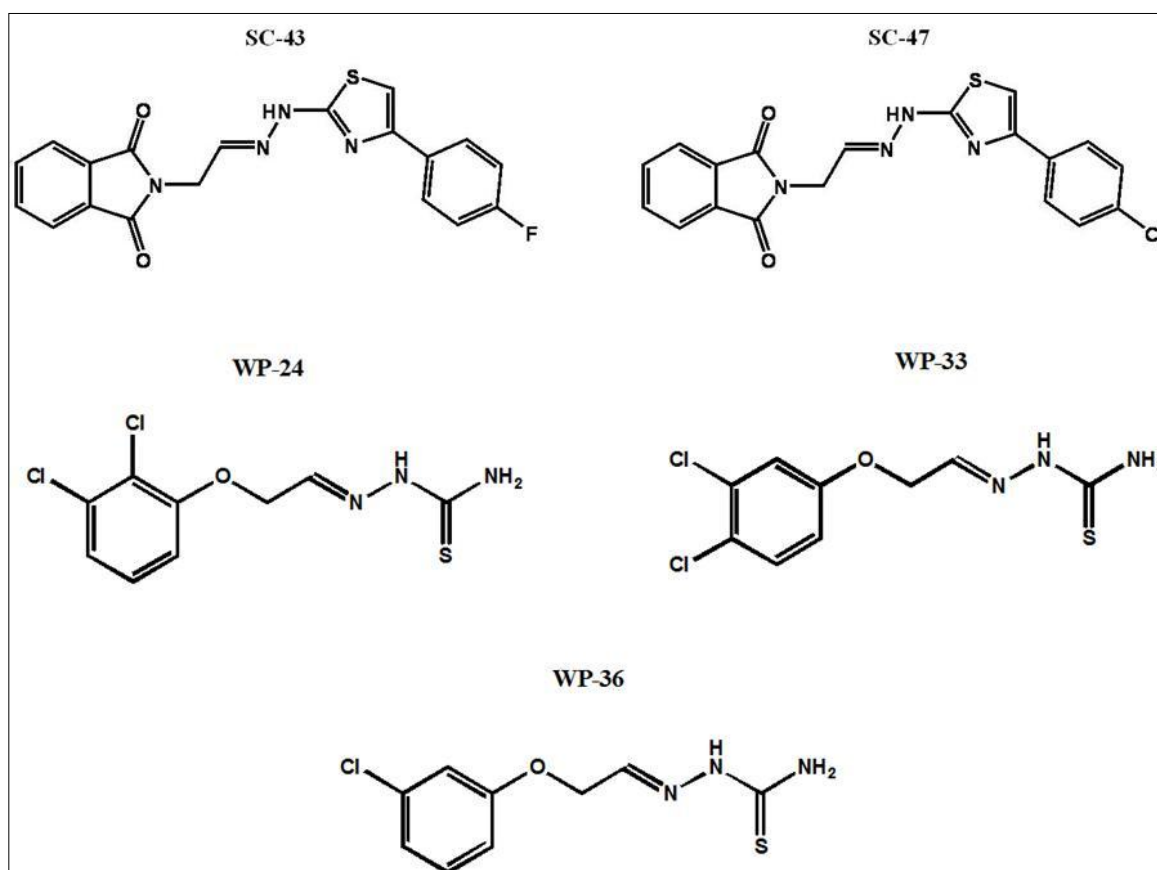
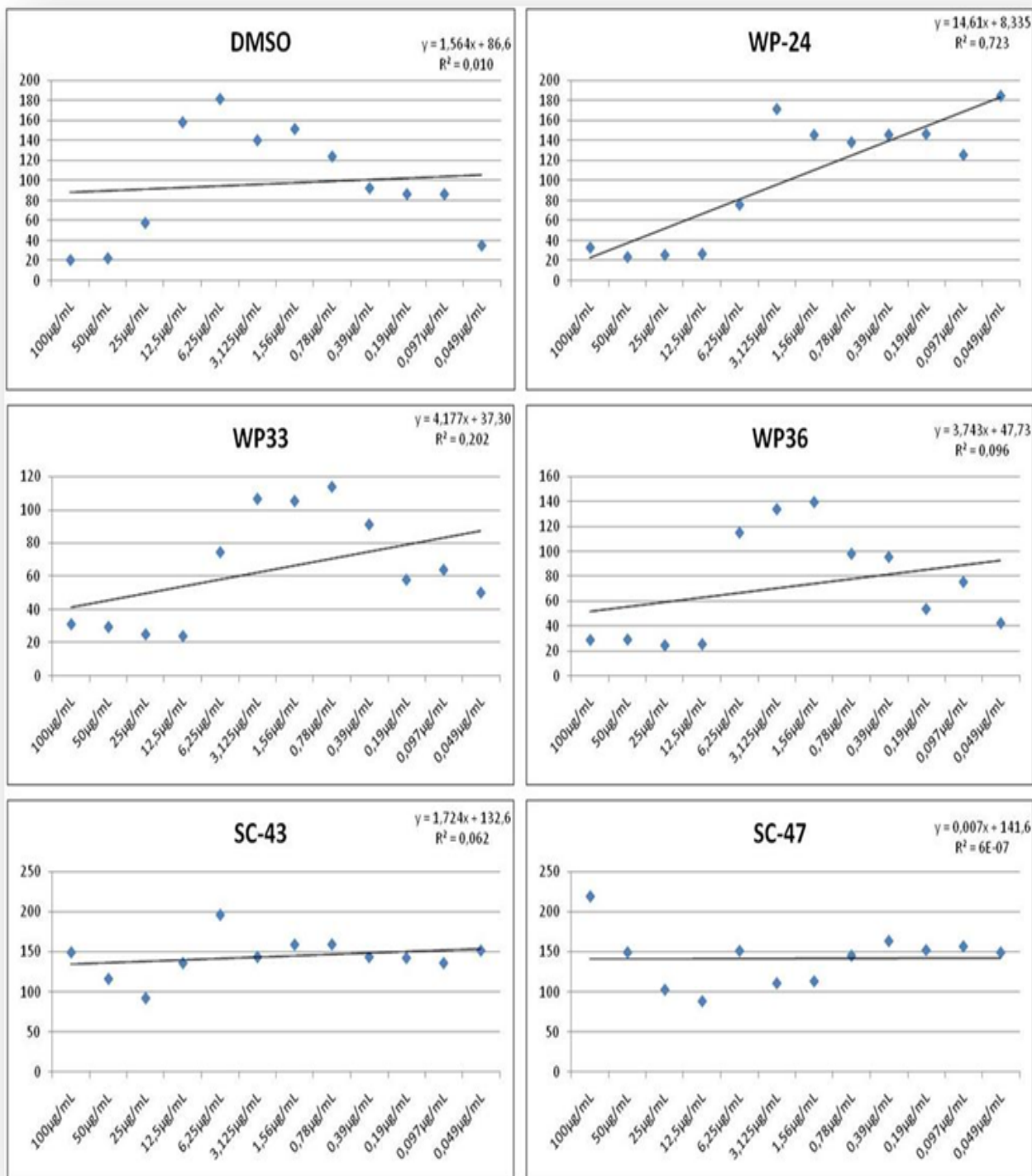


Figura 4: Estrutura química das tiossemicarbazonas e phtalyl-tiazol avaliadas.

4.2. Avaliação da Citotoxicidade

A avaliação da Citotoxicidade frente às células Vero E6 foi determinada pela técnica de MTT utilizando concentrações dos compostos variando de 0,049 μ g/mL a 100 μ g/mL. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada por comparação da absorbância das células tratadas com as células não tratadas (Figura 5). E após análise, foi determinada a concentração de 5 μ g/mL dos compostos para a realização dos ensaios subseqüentes.



1. Figura 5: Avaliação da Citotoxicidade. Concentração citotóxica a 50% da monocamada celular (CC₅₀) dos compostos frente à célula Vero E6.

4.3. Eficiência da inibição da replicação viral em células tratadas segundo inibição do número de placas

As porcentagens de placas formadas devido à replicação viral de YFV em células tratadas com SC-43 (39,2%), SC-47 (65,3%), WP-24 (74%), WP-33(78,3%) e WP-36 (74%) foram inferiores a obtida em células não tratadas, indicando que houve inibição da replicação viral, principalmente no tratamento com os compostos WP-33 e WP-36, conforme mostra a Figura 6.

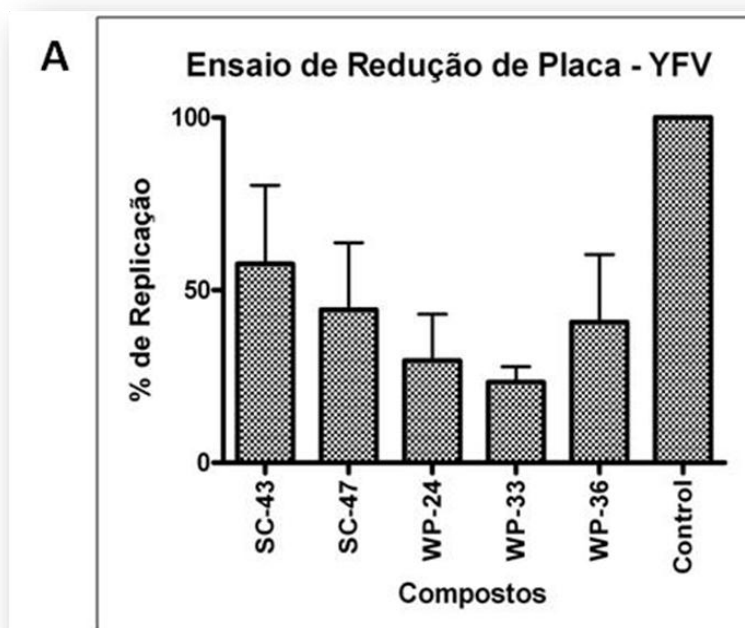


Figura 6: Ensaio de Redução de Placa - YFV. Inibição da replicação de YFV em células tratadas segundo % de número de placas formadas. Eixo Y: % da replicação viral. Eixo X: células tratadas.

Nos ensaios realizados com SLEV, as porcentagens de placas formadas devido à replicação viral de YFV em células tratadas com SC-43 (60,5%), SC-47 (75,9%), WP-24 (48,5%), WP-33(51,3%) e WP-36 (40,5%) também foram inferiores a obtida em células não tratadas, indicando que houve inibição da replicação viral, principalmente no tratamento com os compostos WP-33 e WP-36, conforme mostra a Figura 7.

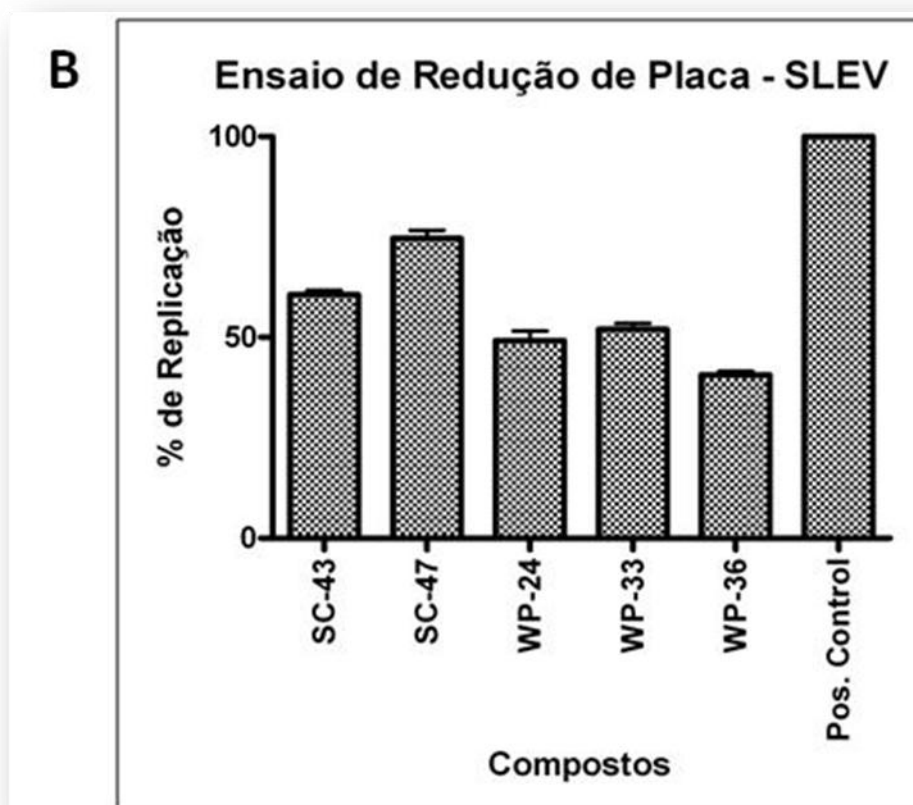


Figura 7: Ensaio de Redução de Placa - SLEV. Inibição da replicação de SLEV em células tratadas segundo % de número de placas formadas. Eixo Y: % da replicação viral. Eixo X: células tratadas.

4.4. Eficiência da inibição da replicação viral em células tratadas segundo imunofluorescência

Células desafiadas com YFV ou SLEV e posteriormente tratadas com os compostos WP-33 e WP-36 foram analisadas quanto a intensidade de imunofluorescência. Conforme Figuras 8 e 9, células tratadas mostraram fluorescência tão baixa quanto a observada em células não-infectadas⁽⁵⁹⁾, indicando que houve inibição da replicação viral conferida pelo tratamento das células.

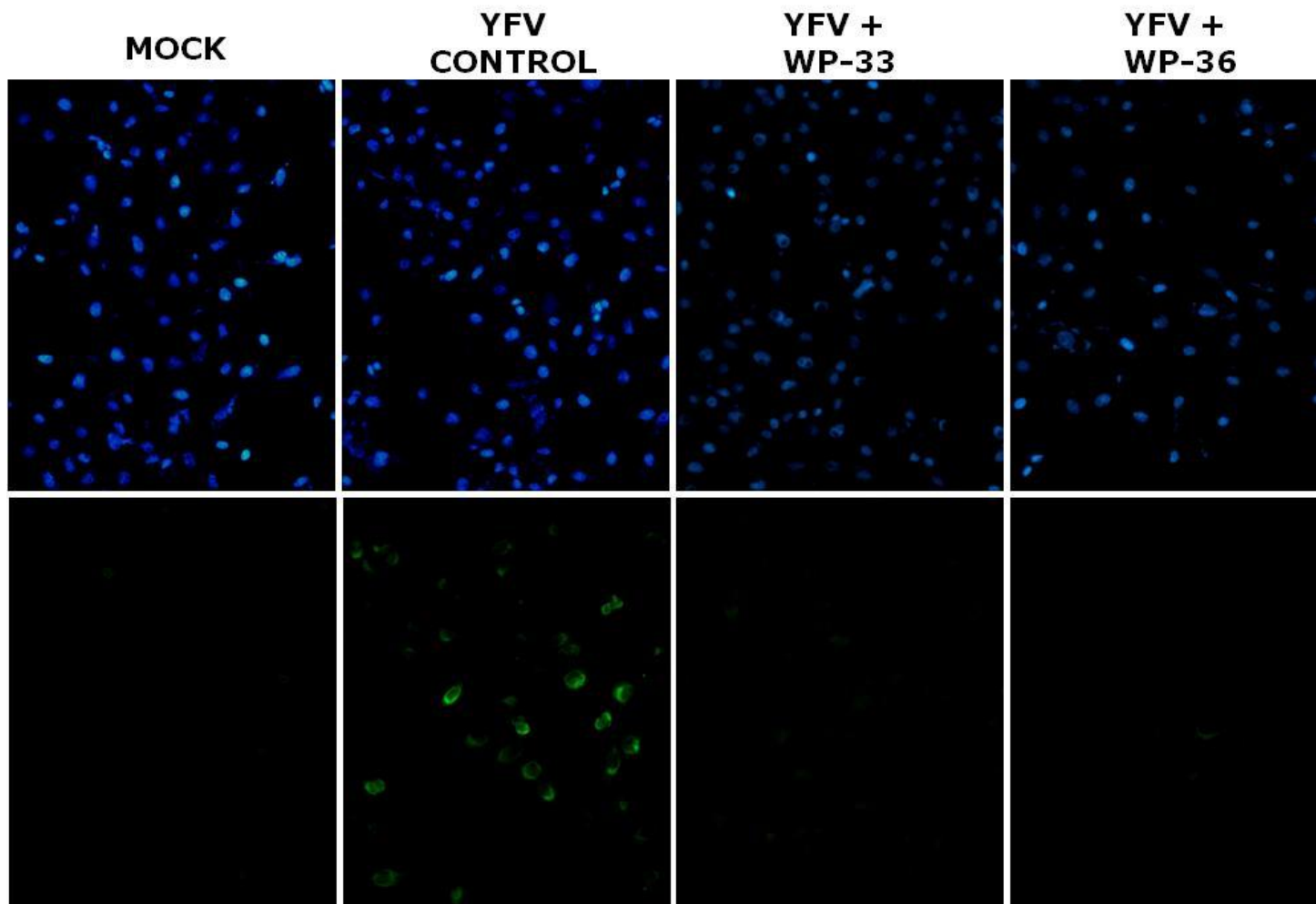


Figura 8: Imunofluorescência das células infectadas com YFV e tratadas com compostos. Células desafiadas com 10 MOI de YFV e tratadas com compostos WP-33 e WP-36, comprovando a inibição da replicação viral. Mock: células não-infectadas. Aumento de 100X

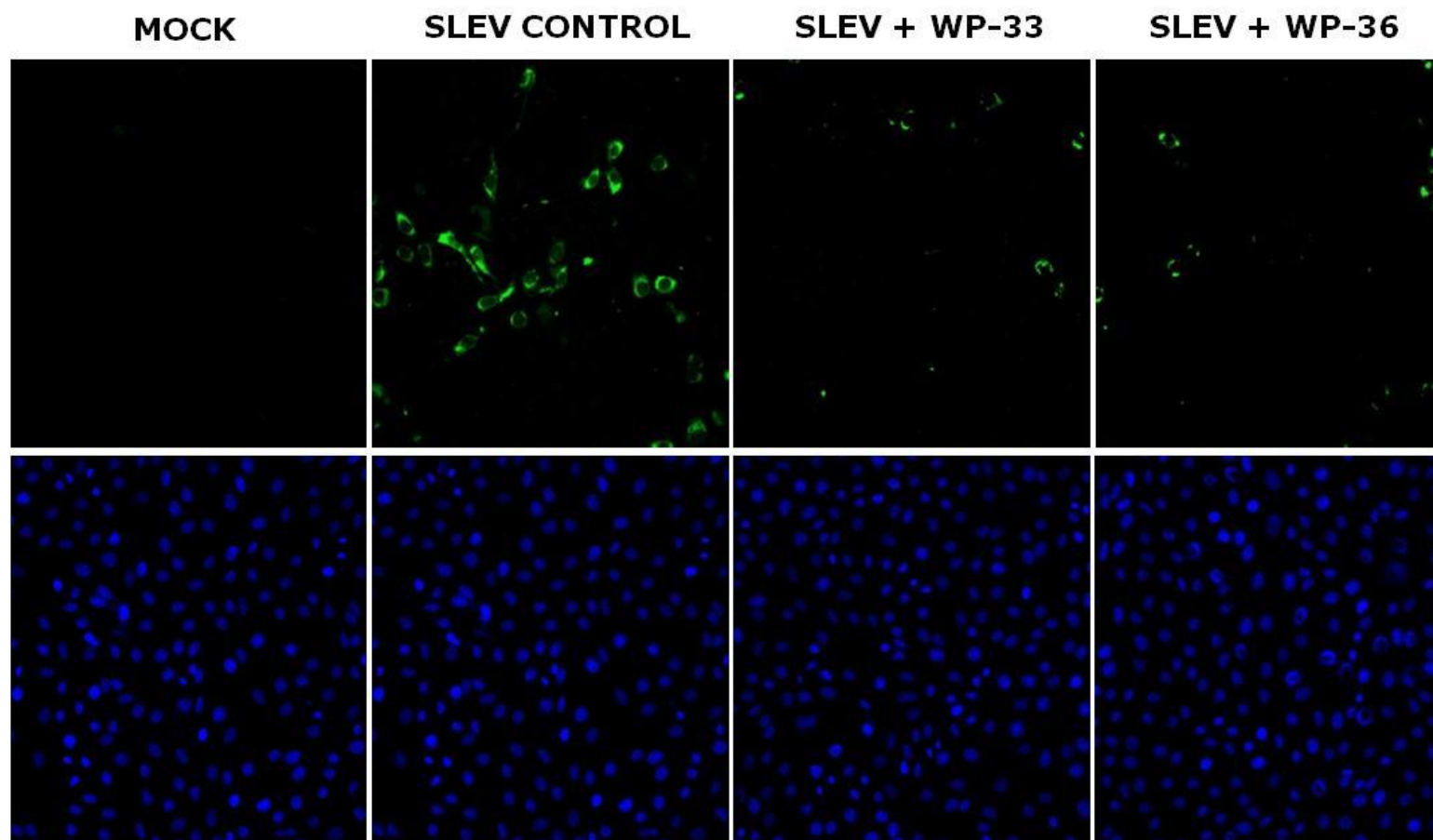


Figura 9: Imunofluorescência das células infectadas com SLEV e tratadas com compostos. Células desafiadas com 10 MOI de SLEV e tratadas com compostos WP-33 e WP-36, comprovando a inibição da replicação viral. Mock: células não-infectadas. Aumento de 100X

4.5. Análise do efeito antiviral pela viabilidade celular

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular das células tratadas com os compostos, antes (pré-tratamento), durante a infecção (*adsorção*) ou após infecção (pós-tratamento), foi realizado ensaio de MTT e a intensidade de absorbância adquirida permitiu a geração de gráficos de comparação. A Figura 10, mostra a viabilidade celular das células infectadas com YFV e tratadas.

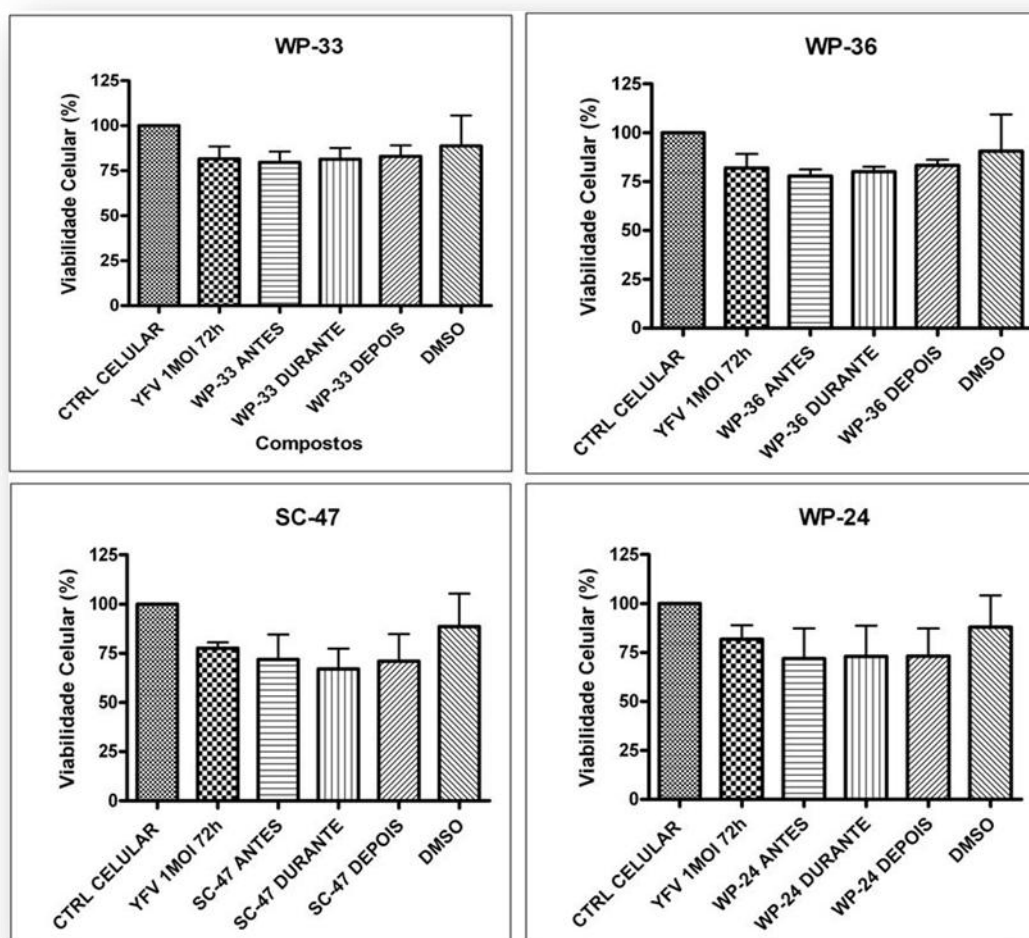


Figura 10: Viabilidade Célular - YFV. Gráficos gerados a partir do valor da absorbância adquirido pelo ensaio de viabilidade celular em células infectadas com YFV e tratadas com os compostos.

Células infectadas com SLEV e tratadas com os compostos apresentaram resultados diferentes quando comparados com a infecção por YFV. Os compostos WP-36 e WP-24 possivelmente mantenham a viabilidade celular no tratamento da infecção viral. (Figura 11)

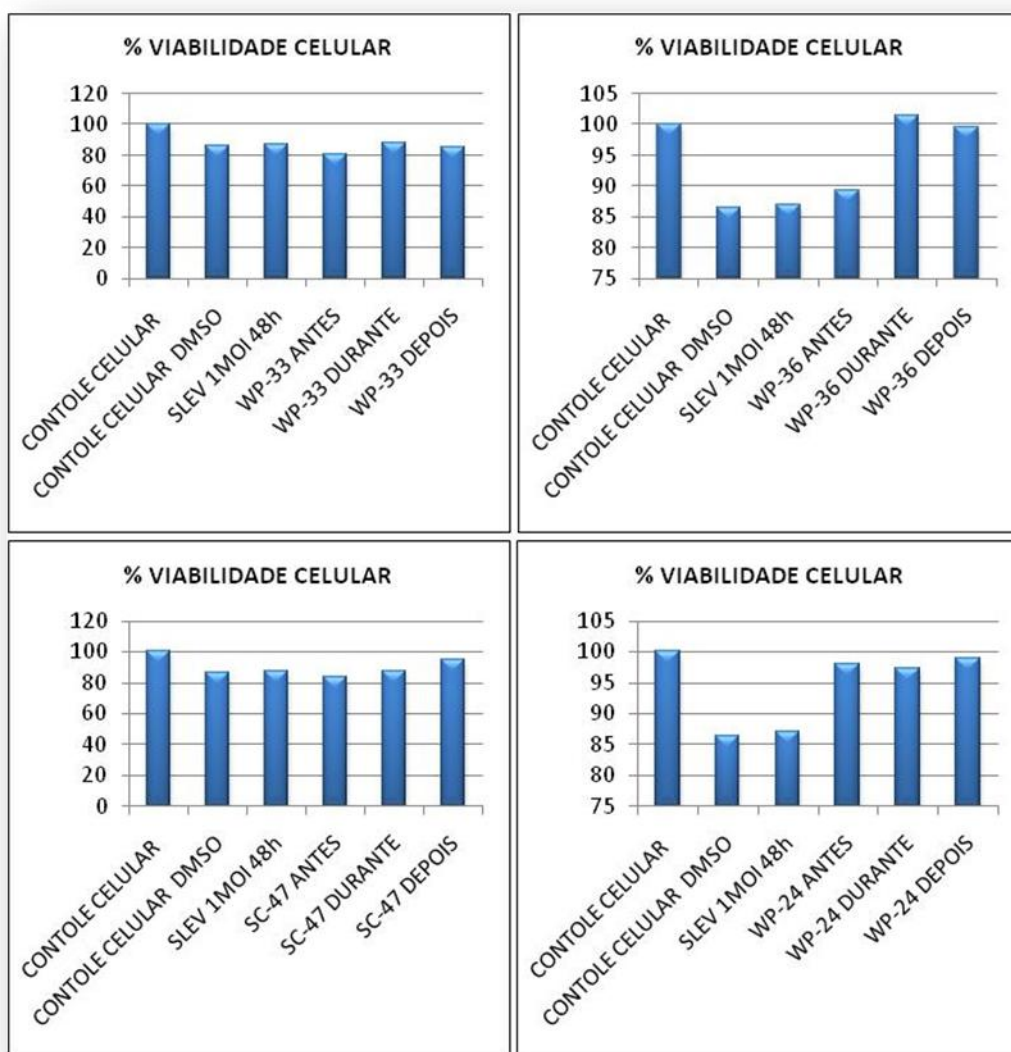


Figura 11: Viabilidade Celular - SLEV. Gráficos gerados a partir do valor da absorbância adquirido pelo ensaio de viabilidade celular em células infectadas com SLEV e tratadas com os compostos.

4.6. Análise da Inibição da Replicação Viral de células tratadas através da Citometria de Fluxo

Células desafiadas com YFV ou SLEV e posteriormente tratadas com os compostos foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência pelo ensaio de Citometria de Fluxo. Conforme Figuras 12 e 13, células infectadas com YFV e tratadas durante 48 horas mostraram intensidade de fluorescência menor quando comparadas com células não-infectadas (Mock), indicando que houve inibição da replicação viral conferida pelo tratamento das células. Quando realizado tratamento de 24h, o resultado não apresentou o mesmo padrão, sugerindo que possivelmente os compostos não agem na fase inicial da replicação.

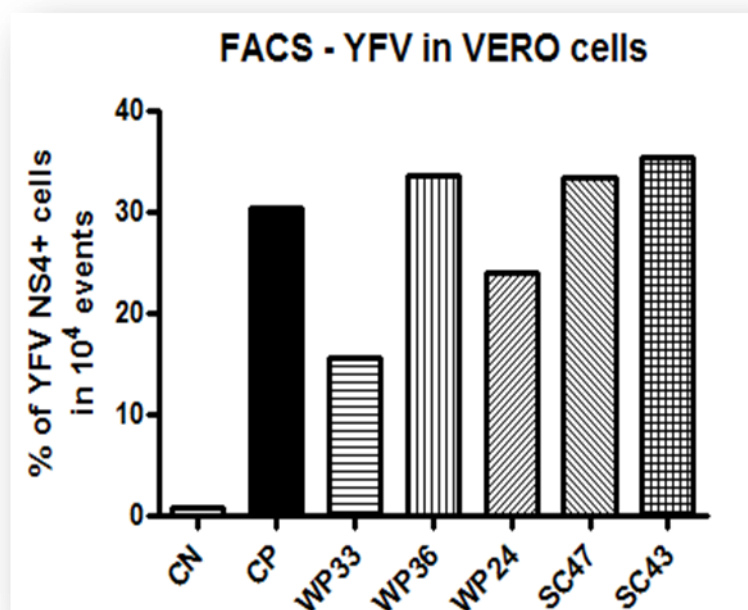


Figura 12. Citometria de Fluxo de células desafiadas com YFV e tratadas durante 48h. Intensidade de fluorescência das células tratadas e controles no tratamento de 48h após infecção com YFV.

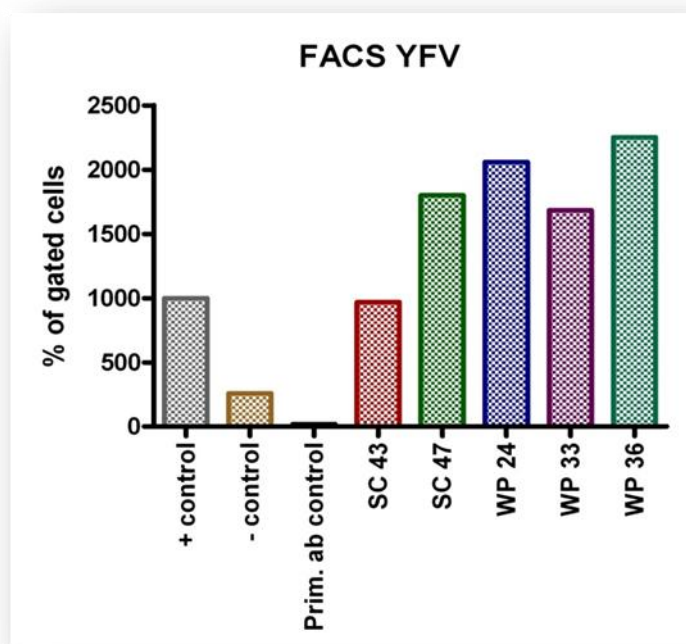


Figura 13. Citometria de Fluxo de células desafiadas com YFV e tratadas durante 24h. Intensidade de fluorescência das células tratadas e controles no tratamento de 24h após infecção com YFV.

As Figuras 14 e 15 mostram células infectadas com SLEV e tratadas durante 48 horas. A intensidade de fluorescência após tratamento é menor quando comparadas com células não-tratadas⁽⁵⁹⁾ após infecção viral, confirmando a inibição da replicação viral conferida pelo tratamento das células. Da mesma forma, o resultado do tratamento durante 24h, apresentou o mesmo padrão da infecção por YFV, corroborando com a sugestão da ação dos compostos na replicação viral.

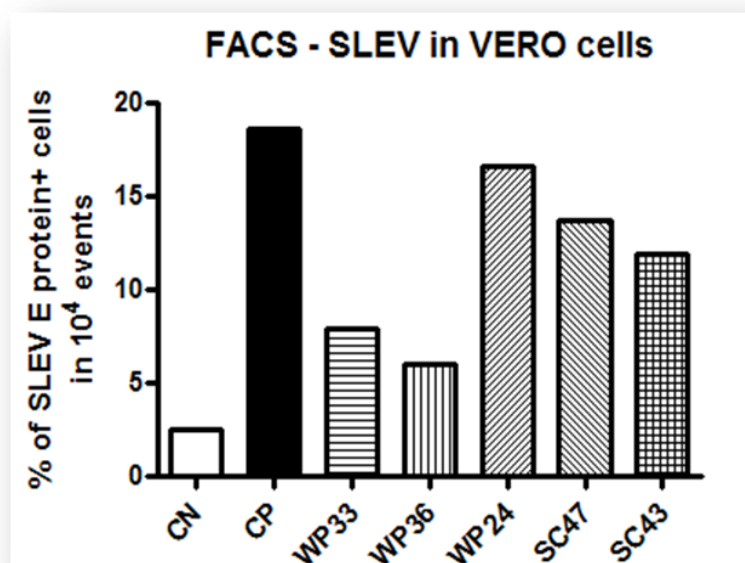


Figura 14. Citometria de Fluxo de células desafiadas com SLEV e tratadas durante 48h. Intensidade de fluorescência das células tratadas e controles no tratamento de 48h após infecção com SLEV.

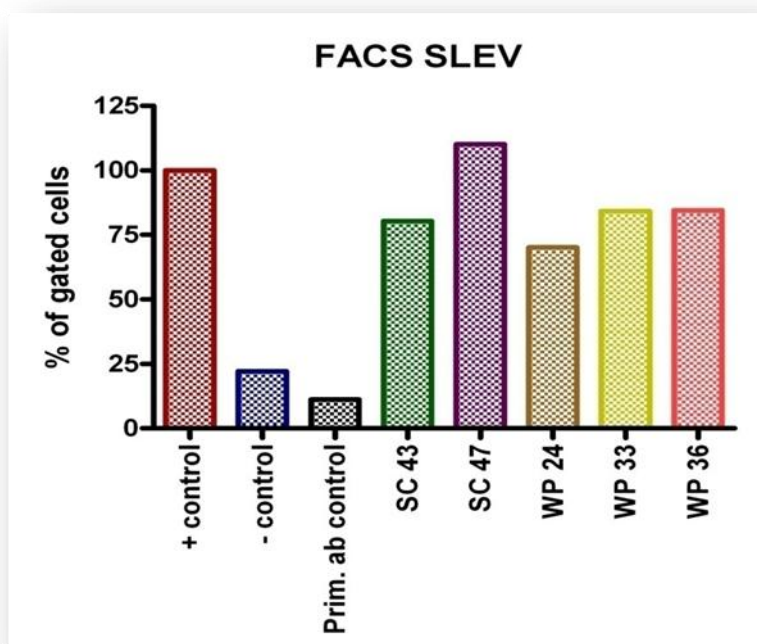


Figura 15. Citometria de Fluxo de células desafiadas com SLEV e tratadas durante 24h. Intensidade de fluorescência das células tratadas e controles no tratamento de 24h após infecção com SLEV.

4.7. Inoculação dos camundongos com YFV

Para analisar se os camundongos eram suscetíveis à infecção, 12 animais foram inoculados via subcutânea com 10^3 ou 10^5 PFU de YFV (Tabela 1). No sexto dia após a infecção, os camundongos foram sacrificados para exame histopatológico do fígado e determinação da carga viral dos soros, cérebros e fígados dos animais. Não foi observada nenhuma placa de lise na titulação, devido a isto, foi realizado PCR em Tempo Real.

Tabela 1. Identificação dos camundongos utilizados e quantidade de vírus inoculado.

Número Amostra	Tipo Camundongo	Quantidade de Vírus Inoculado
1	ABR	NI
2	ABR	NI
3	ABR	NI
4	SV129	NI
5	SV129	NI
6	ABR	10^3 PFU
7	ABR	10^3 PFU
8	ABR	10^3 PFU
9	ABR	10^5 PFU
10	ABR	10^5 PFU
11	ABR	10^5 PFU
12	SV129	10^5 PFU
13	SV129	10^3 PFU
14	SV129	10^3 PFU
15	SV129	10^5 PFU
16	SV129	10^5 PFU
17	SV129	10^5 PFU

ABR: camundongos nocaute para receptores de *Interferon* α e β , SV129: camundongos selvagens; NI: não infectado

4.7.1. Ensaio Laboratoriais

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório Central do Hospital de Base de São Jose do Rio Preto. Foram analisadas as transaminases (AST, ALT), hematócrito, bem como a fosfatase alcalina (ALP) para verificar possível alteração das enzimas hepática, uma vez que tais enzimas tendem a aumentar quando o fígado sofre alguma lesão. Os valores de referencia foram obtidos por Carpenter, 2010⁽⁹⁸⁾ (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Determinação dos testes bioquímicos e hematológicos

Nº da amostra	Camundongo	Quantidade Vírus Inoculado	Ht	AST	ALT	ALP
1	ABR	NI	49	275	47	105
2	ABR	NI	46	102	39	161
3	ABR	NI	48	565	160	116
4	SV129	NI	50	325	52	149
5	SV129	NI	52	603	69	143
6	ABR	10 ³	50	306	60	90
7	ABR	10 ³	45	224	66	104
8	ABR	10 ³	48	145	66	102
9	ABR	10 ⁵	0*	216	65	163
10	ABR	10 ⁵	42	138	50	67
11	ABR	10 ⁵	48	484	64	113
12	ABR	10 ⁵	0*	103	34	148
13	SV129	10 ³	50	1500	153	109
14	SV129	10 ³	48	227	69	82
15	SV129	10 ⁵	45	475	74	125
16	SV129	10 ⁵	45	231	56	126
17	SV129	10 ⁵	48	176	69	130

ABR: camundongos nocaute para receptores de *Interferon* α e β ; SV129: camundongos selvagens; NI: não infectado; Ht: hematócrito; AST: Aspartato Aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; ALP: Fosfatase Alcalina; * Falta de material biológico

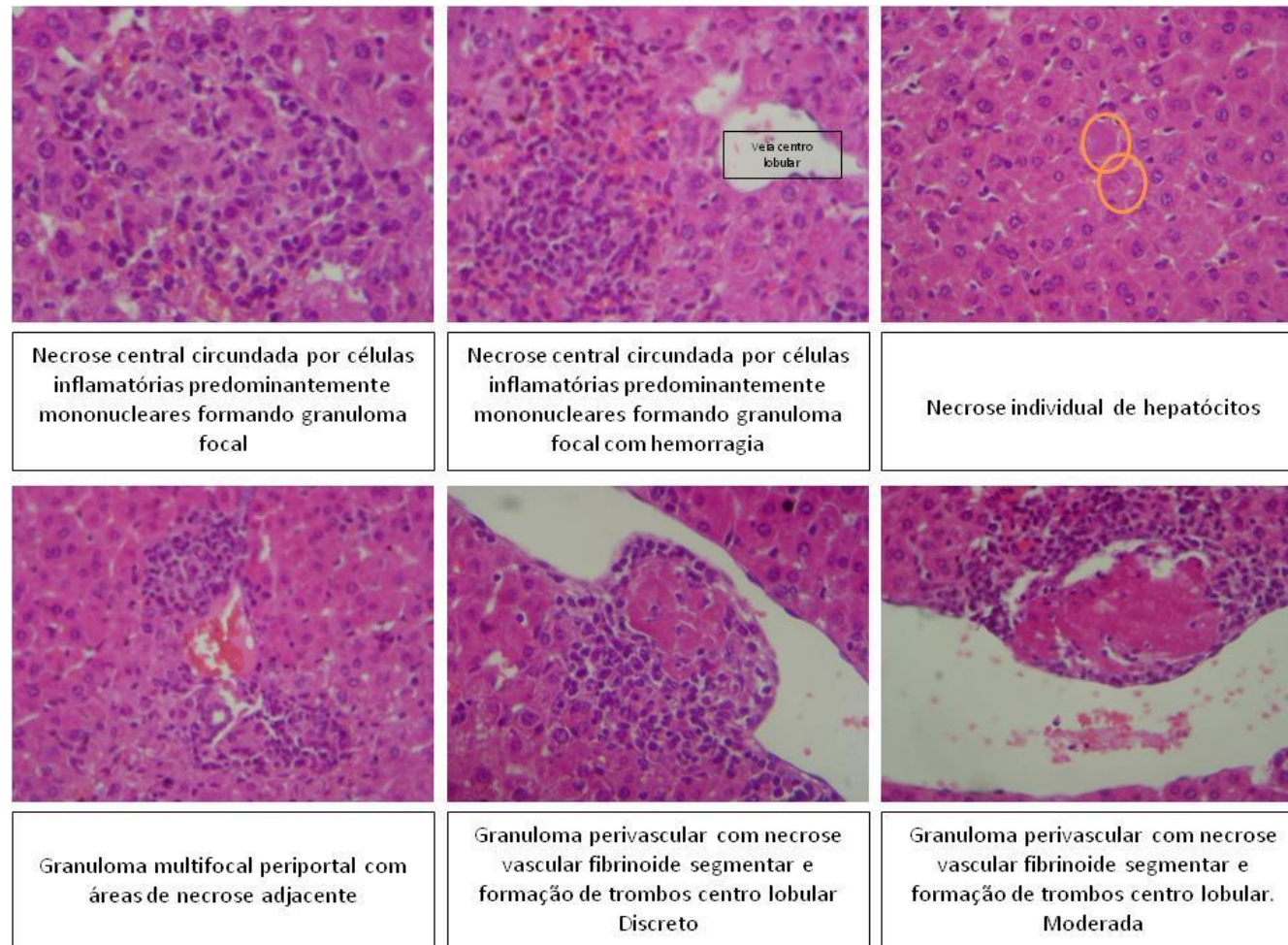
Tabela 3. Valores de Referência de animais segundo Carpenter, 2010.

Valores de Referência	
Ht:	35-40%
ALT:	26-77 U/L
AST:	54-269 U/L
ALP:	45-222 UI/L

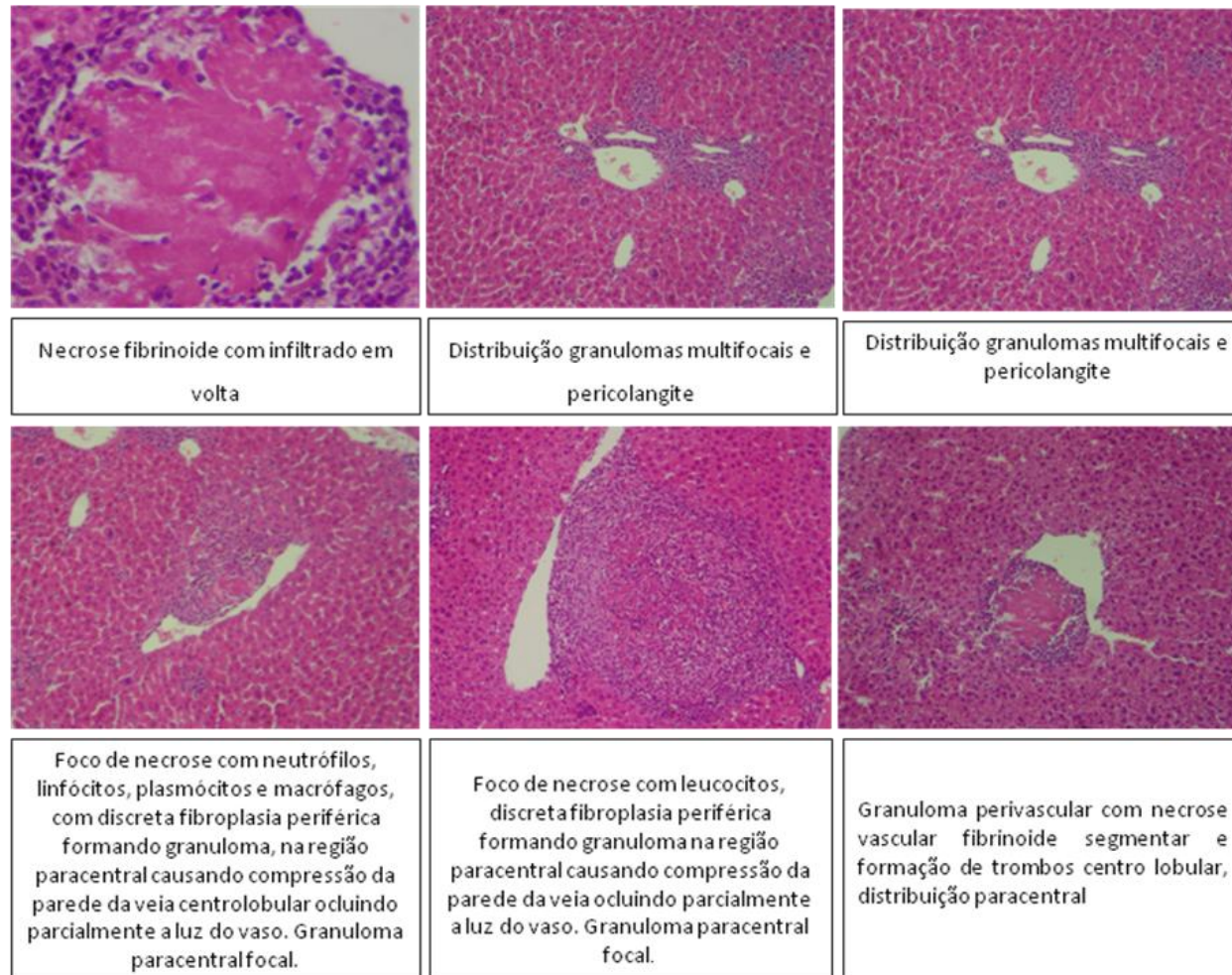
Ht: hematócrito; AST: Aspartato Aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; ALP: Fosfatase Alcalina

4.7.2. Análise histopatológica do fígado dos camundongos inoculados com YFV

Para análise histopatológica dos fígados, os camundongos foram infectados e sacrificados como mencionado anteriormente e realizado ensaio histopatológico. Análise das lâminas mostrou que os camundongos nocautes infectados apresentavam infiltrados celulares no fígado, necroses centrais circundadas por células inflamatórias mononucleares, necrose individual dos hepatócitos e granulomas perivasculares (Figuras 16 e 17).



Firua 16: Análise Hitopatológica dos fígados dos animais. Histopatologia do fígado dos camundongos nocautes infectados. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. Aumento de 400X.



Firua 17: Análise Hitopatológica dos fígados dos animais. Histopatologia do fígado dos camundongos nocautes infectados. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. Aumento de 400X.

4.7.3. PCR em Tempo Real (qPCR) para a avaliação da replicação de YFV.

Para analisar se os camundongos eram suscetíveis a infecção, foi realizado qPCR para confirmar o ensaio de placas realizado anteriormente. Após geração do gráfico, os dados não permitem confirmar a infecção nestes órgãos, conforme Figura 18.

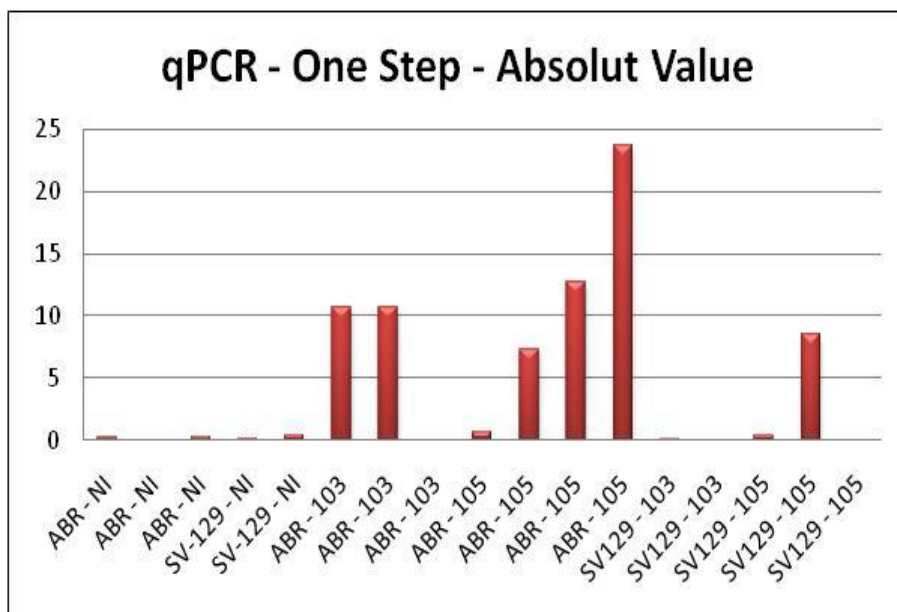


Figura 18: Avaliação da replicação viral por qPCR. PCR em Real Time (qPCR) para a quantificação da replicação de YFV em fígados de camundongos nocautes infectados.

4.7.4. Ensaio de Neutralização

O ensaio de neutralização foi realizado com o soro de todos os camundongos, nocautes e silvestres, infectados ou não. Com o intuito de verificar o efeito de neutralização causado pelos anticorpos secretados pelo sistema imunológico dos animais contra o vírus YFV. Tal ensaio é considerado o teste mais sensível e mais específico para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes, sendo o método de referencia para a avaliação da resposta imune protetora após vacinação. A Tabela 4 mostra a diluição dos anticorpos neutralizantes dos camundongos infectados.

Tabela 4. Ensaio de Neutralização dos camundongos.

Número Amostra	Tipo Camundongo	Quantidade de Vírus Inoculado	Neutralização
1	ABR	NI	Negativo
2	ABR	NI	Negativo
3	ABR	NI	Negativo
4	SV129	NI	Negativo
5	SV129	NI	Negativo
6	ABR	10 ³ PFU	Negativo
7	ABR	10 ³ PFU	1/16
8	ABR	10 ³ PFU	1/64
9	ABR	10 ⁵ PFU	1/8
10	ABR	10 ⁵ PFU	Negativo
11	ABR	10 ⁵ PFU	1/2048
12	SV129	10 ⁵ PFU	1/8
13	SV129	10 ³ PFU	1/8
14	SV129	10 ³ PFU	Negativo
15	SV129	10 ⁵ PFU	1/8
16	SV129	10 ⁵ PFU	Negativo
17	SV129	10 ⁵ PFU	Negativo

ABR: camundongos nocaute para receptores de *Interferon* α e β , SV129: camundongos selvagens; NI: não infectado

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

Vários estudos anteriores descrevem a utilização de substâncias sintéticas ou naturais como potenciais agentes antivirais em ensaios *in vivo* e *in vitro*^(40, 99, 100). Entretanto, atualmente não existem fármacos disponíveis no mercado para tratamento contra *Flavivirus*, especialmente YFV e SLEV. Sendo assim, a busca por antivirais torna-se de suma importância, uma vez que infecções por YFV em regiões silvestres é comum, bem como o aparecimento de SLEV, fato extremamente preocupante para o Brasil uma vez que a detecção deste vírus não era comum no país até pouco tempo⁽⁵⁵⁾.

Sabe-se que algumas estruturas sintéticas estão sendo testadas contra YFV⁽⁶⁷⁾ e que a Ribavarina (1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida), a qual é um análogo de nucleosídeo de purina com atividade de largo espectro, é eficiente contra vários tipos de vírus de DNA e RNA⁽¹⁰¹⁾. Entretanto, a ribavirina associada ao *Interferon-γ* já foi testada sem resultados satisfatórios contra YFV, pois quando utilizada em modelos primatas não-humanos a droga não apresentou eficácia em inibir o curso da doença⁽¹⁰²⁾. Moléculas semelhantes à Ribavarina, tais como Taribavirin hydrochloride, 1-αβ-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamidine (Viramidine®, Valeant Pharmaceutical International, Singapore) mostram eficiência contra problemas hematológicos⁽¹⁰³⁾. Gabrielsen e colaboradores (1994) demonstraram a eficiência de um composto inibidor da descarboxilase 5β-monofosfato, 6-azauridine contra infecção por YFV e JEV. Entretanto, o tratamento não foi eficaz em camundongos infectados com JEV⁽¹⁰⁴⁾. Compostos de Iminocyclitol, moléculas com a presença de uma cabeça deoxynojirimycin, inibiram a montagem de partículas virais no retículo endoplasmático do hospedeiro contra infecções pelos gêneros *Flavivirus* e *Pestivirus*⁽¹⁰⁵⁾. Puig-Basaqoit e colaboradores (2006) demonstraram a inibição de *Flavivirus* em cultura celular com a

utilização da molécula Triarylpyrazoline{[5-(4-chloro-phenyl)-3-thiophen-2-yl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-phenyl-methanone} bem como atividade antiviral contra outros vírus de RNA⁽¹⁰⁶⁾. Outro agente inibidor de flavivirus de amplo espectro é o 2-amino-8-(β -D-ribofuranosyl)imidazo [1,2-*a*]-*s*-triazine-4-one (ZX-2401), o qual tem ampla ação quando utilizado em sinergismo ao *Interferon*⁽¹⁰⁷⁾.

No presente estudo, avaliamos a potencial atividade antiviral de moléculas com núcleos de thiossemicarbazone ou phtalyl-thiazole contra os vírus da Febre Amarela e da Encefalite de Saint Louis. Os resultados obtidos mostraram que especialmente dois dos compostos testados possuem potencial antiviral.

Para que um antiviral seja eficiente, este deve interferir minimamente na estrutura e metabolismo da célula do hospedeiro, não apresentar toxicidade, e ao mesmo tempo inibir a replicação viral⁽¹⁰⁸⁾. Fatores como a concentração do material teste, tempo de exposição, linhagem celular, entre outros, podem ou não apresentar diferentes intensidades de lesão celular⁽¹⁰⁹⁾. Sendo assim, a avaliação da citotoxicidade pelos compostos é de extrema importância, pois, alterações na sobrevivência, multiplicação e metabolização das células utilizadas nos ensaios, causadas pelos compostos, levariam ao descarte dos mesmos, uma vez que não se encaixariam como potentes antivirais⁽¹¹⁰⁾. No presente estudo, a citotoxicidade dos compostos foi baixa quando utilizados na concentração de 5 μ g/mL, o que possibilitou a continuidade do trabalho.

A avaliação antiviral dos compostos foi realizada primeiramente pelo ensaio de redução de placas. O composto WP-33 mostrou reduzir significativamente a taxa de replicação de YFV (78,3%), enquanto o composto WP-36 inibiu a replicação de SLEV (59,5%). Estes compostos são derivados de thiosemicarbasones. Moléculas de thiosemicarbasones já foram demonstradas com atividade antiviral⁽¹¹¹⁾ e alguns

derivados (isatin-thiosemicarbazones) apresentaram a mesma efetividade contra Varíola em um estudo na Índia realizado por Bauer e colaboradores⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾, onde também foi testada no tratamento de HSV⁽¹¹⁴⁾. Nossos dados corroboram com a atividade antiviral previamente testada dos derivados de thiosemicarbazones. A inibição da replicação viral mediada pelos compostos SC-43, SC-47 e WP-24, os quais apresentam anel Thiazol em sua estrutura, foram significativas para YFV - SC-43(39,2%), SC-47(65,3%) e WP-24 (74%) – bem como contra o SLEV – SC-43(39,5%), SC-47(24,1%) e WP-24 (51,5%). Moléculas contendo anel de thiazol já foram descritos como potentes antimicrobianos⁽⁸⁵⁾, antiprotozoários⁽⁸⁹⁾, antiinflamatórios⁽⁸⁷⁾, antifúngicos⁽⁸⁶⁾ e antituberculose⁽⁸⁸⁾, o que levou a hipótese para tratamento antiviral utilizada no presente estudo.

Para confirmar os resultados do ensaio de redução de placas, realizou-se citometria de fluxo de células tratadas com os compostos e os dados obtidos foram os esperados. A inibição da replicação do YFV com o uso das moléculas WP-33 (49%) e WP-24 (20,7%) obtidos pela citometria de fluxo, corroboraram com o ensaio anterior, mostrando que os compostos são efetivos contra este vírus, especialmente o composto WP-33, o qual apresentou maior efeito inibitório sobre a replicação. Nas células infectadas com SLEV, foi possível observar que os compostos WP-36 (67,5%), WP-33 (57,6%) e SC-43 (36,1%) mostraram efeito inibitório sobre a replicação. Dessa forma, podemos confirmar a efetividade destes compostos em inibir a replicação viral.

Novamente, os resultados obtidos anteriormente, com os compostos WP-33 e WP-36, foram confirmados por imunofluorescência utilizando anticorpos policlonais contra proteínas virais de YFV e SLEV em células tratadas. Nestes dois grupos houve um menor número de células marcadas com o uso do composto WP-33 para YFV e com

WP-36 para SLEV, indicando a inibição da expressão das proteínas virais, o que corrobora com ensaios anteriores.

Com o intuito de verificar a viabilidade celular, células Vero E6 foram submetidas ao tratamento com os compostos antes da infecção (pré-tratamento), após a infecção (pós-tratamento) e durante a infecção (adsorção), tanto para YFV como para SLEV. Os resultados mostraram que a viabilidade celular é mantida tanto nas células tratadas e infectadas com YFV como nas células somente infectadas com YFV. Entretanto, nas células tratadas com os compostos WP-36 e WP-24 e infectadas com SLEV, a viabilidade celular se mostrou muito próxima à observada no controle celular.

Com o sucesso dos ensaios *in vitro*, a realização de testes *in vivo* fez-se necessária. A dificuldade de encontrar um modelo animal para flavivirus acessível impulsionou o presente estudo a investigar a patogenicidade de YFV em camundongos ABR, os quais são nocautes para receptores de *Interferon* β e α .

Já foi descrito previamente que pacientes infectados com YFV, com sintomatologia grave, apresentam alterações em vários órgãos, no entanto, o fígado é o órgão mais afetado⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾, apresentando necrose nos hepatócitos, granulomas, esteatose microvesicular, infiltrados inflamatórios, entre outros. Tais características patológicas são bastante específicas para YFV^(115, 117, 118). Em macacos *Rhesus* infectados com YFV, o principal achado nos três primeiros dias da infecção foi necrose das células de Kupffer no fígado, esteatose macro e microvesicular^(119, 120). Estudos indicam que a necrose correlaciona-se com o acúmulo de antígenos virais nos hepatócitos⁽¹²⁰⁾. Embora este modelo animal apresente características específicas da infecção viral, o uso do mesmo é inviável em laboratórios de pequeno porte, sendo necessário o desenvolvimento de um modelo animal de pequeno porte.

No presente estudo, embora os animais não tenham apresentado padrão histopatológico similar ao descrito em humanos⁽¹¹⁷⁾ algumas características hepáticas mostraram ser suscetíveis a infecção por YFV, sendo observadas esteatose hepática e esplenomegalia (dados não mostrados), bem como infiltrados celulares e necrose dos hepatócitos, corroborando assim, com os dados da literatura.

Sbrana e colaboradores (2006)⁽¹²¹⁾ compararam os valores bioquímicos de humanos e hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com YFV e observaram que a primeira alteração bioquímica detectada em hamsters foi o aumento das transaminases (ALT/AST), os quais são potentes marcadores hepáticos. Os dados do presente estudo não mostraram alterações nos valores das transaminases, com exceção do camundongo 13. Entretanto, este animal apresentava o soro com muita hemólise, o que pode ter interferido no resultado do teste. Outra hipótese para a ausência de alterações bioquímicas pode estar no fato da utilização de um kit bioquímico específico para humano, o qual, talvez, não consiga diferenciar entre enzimas humanas e murinas.

Embora tenham sido detectadas alterações histopatológicas no fígado, dos animais nocautes, infectados com YFV, o ensaio de placa realizado com o soro e órgãos (cérebro, baço e fígado) destes animais não apresentou título viral. Sendo assim, foi realizado qPCR para comparar os dados obtidos, uma vez que esta técnica é extremamente sensível e específica. Após análise dos dados, foi observado que os títulos virais apresentados não poderiam confirmar infecção no tecido estudado, corroborando com o resultado do ensaio anterior.

Sendo assim, realizou-se o ensaio de neutralização para titular o nível de anticorpos nos animais. Tal experimento é considerado o teste mais sensível e específico para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes, sendo um

método de referência para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação⁽¹²²⁾. Sabe-se que a imunização por vacinação é a maneira mais eficaz de prevenção da YFV, sendo fundamental para prevenir epidemias (OMS, 2009). A vacina 17DD é segura e imunogênica, induzindo a formação de uma rápida resposta imune específica⁽¹²³⁾. No presente estudo, os testes de infecção dos camundongos nocautes foram realizados com cepa vacinal 17DD, sendo assim, o ensaio de neutralização mostrou que os camundongos foram infectados pelo vírus, pois o resultado do experimento revelou altas concentrações de anticorpos.

Baseado no resultado do ensaio de neutralização e na falta de título viral apresentado nos ensaios de quantificação viral, é possível que os camundongos não tenham apresentado sintomatologia devido ao fato de se tornarem imunes a doença, pela utilização de uma cepa vacinal. Uma forma de resolver tal problema e melhorar o estudo com camundongos ABR seria a utilização de cepas virais selvagens, pois, mesmo utilizando a cepa vacinal, foi possível detectar alterações histopatológicas no fígado destes camundongos. Como não foi possível utilizar o modelo animal sugerido, os testes *in vivo* com os compostos não foram realizados.

Dessa forma, a escolha apropriada de moléculas pode aumentar a eficiência da droga em alcançar seu alvo. No estudo, os derivados de tiosemicarbazones foram os mais eficientes em inibir a replicação de YFV e SLEV, apresentando baixa citotoxicidade, podendo ser considerados potentes agentes antivirais. Até o momento, este é, provavelmente, o primeiro estudo demonstrando a eficácia destes derivados como drogas antivirais.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

1. Dentre os compostos analisados, os derivados de tiosemicarbasones (WP-33 e WP-36) são os mais eficazes contra a replicação de YFV e SLEV, respectivamente.
2. A inibição da replicação pode ser observada por vários ensaios *in vitro*, como Imunofluorescência, Citometria de Fluxo e Ensaio de Redução de Placas. Tais resultados evidenciam as moléculas como potentes alternativas no tratamento de YFV e SLEV. Mais estudos são necessários para a determinação do mecanismo de ação destas moléculas;
3. Os camundongos ABR apresentaram alterações histopatológicas, sendo este um indicativo de infecção. O Ensaio de placa e qPCR não permitiram confirmar a infecção dos animais. O Ensaio de Neutralização mostrou anticorpos em altas concentrações. Mais estudos sobre o modelo animal, utilizando cepas virais selvagens, são necessários para posteriores ensaios *in vivo* com os compostos que apresentaram atividade antiviral;
4. Até o momento, este é, provavelmente, o primeiro estudo demonstrando a eficácia destes derivados como drogas *antivirais*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Mar-Apr;40(2):224-9.
2. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, PINHEIRO FP, Travassos da Rosa JFS. Arboviroses. VERONESI: Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 289-302.
3. Peters CJ. Emerging Viral Diseases. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 605-25.
4. VASCONCELOS PFCTDR, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS, DA ROSA, J.F.S. Arboviroses. Sao Paulo; 2005.
5. Nathanson N. Epidemiology. In: Knipe DMH, P. M., editor. *Fields Virology*. 5 ed; 2007. p. 424-46.
6. Fonseca BAL, Figueiredo LTM. Febre Amarela VERONESI: Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 2002.
7. Nogueira ML, Nogueira MC, Pacca C. Arboviral encephalitis and RNAi treatment. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2011 Dec 1;11(4):296-304.
8. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000 Nov;2(13):1643-9.
9. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002 Feb;10(2):100-3.
10. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. *FIELDS' virology*. 4ed ed. Philadelphia: LWW; 2001.

11. Degallier N, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Sá Filho GC, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG, et al. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute; 1998.
12. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002 Jul-Aug;33(4):330-42.
13. Bernardes-Terzian AC, de-Moraes-Bronzoni RV, Drumond BP, Da Silva-Nunes M, da-Silva NS, Urbano-Ferreira M, et al. Sporadic oropouche virus infection, acre, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 Feb;15(2):348-50.
14. Mondini A, Bronzoni RVM, Nunes SHP, Chiaravalloti Neto F, Massad E, Alonso WJ, et al. Spatio-Temporal Tracking and Phylodynamics of an Urban Dengue 3 Outbreak in São Paulo, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Disease.* 2009;3(5).
15. Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. Flavivirus. In: Knipe DMH, Peter M., editor. *Fields Virology: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.*
16. Rice BDLH-JuTCM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007.
17. Fonseca BAL, Figueiredo, L.T.M. Dengue. Veronesi: *Tratado de Infectologia.* Terceira ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 343-56.
18. dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira, II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res.* 1995 Jan;35(1):35-41.
19. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 1985 Aug 23;229(4715):726-33.

20. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
21. Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Mar-Apr;36(2):275-93.
22. Pastorino B, Nougairede A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Res.* 2010 Sep;87(3):281-94.
23. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001 Aug;1(1):11-20.
24. Knipe DMH, Peter M. Flaviviridae. In: *Fields Virology*. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
25. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4611-21.
26. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae. *Fields Virology*. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-303.
27. Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol.* 2002 May;76(10):4773-84.
28. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *Embo J.* 2002 Jun 3;21(11):2757-68.
29. Lindenbach BD, Thiel H, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-52.

30. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009 Apr 23;5(4):318-28.
31. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*. 2008 Oct;80(1):11-22.
32. Damonte EB, Pujol CA, Coto CE. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv Virus Res*. 2004;63:239-85.
33. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22.
34. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):23698-708.
35. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*. 2006 Oct;87(Pt 10):2755-66.
36. Vasconcelos PFdR, A.P.A.; Pinheiro, F.P.; da Rosa, J.F.S.T. *Arboviroses*. Veronesi: Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 289-302.
37. Tauil PL, Santos JB, Moraes MAP. Febre Amarela. *Dinâmicas das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1755-65.
38. Benchimol JL. Febre Amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2001.
39. Van der Stuyft P, Gianella A, Pirard M, Cespedes J, Lora J, Peredo C, et al. Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. *Lancet*. 1999 May 8;353(9164):1558-62.

40. Pacca CC, Severino AA, Mondini A, Rahal P, D'Avila S G, Cordeiro JA, et al. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. *Virus Genes*. 2009 Apr;38(2):224-31.
41. Massad E, Burattini MN, Coutinho FA, Lopez LF. Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in Sao Paulo State, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2003 Aug;37(4):477-84.
42. Sabattini M, Avilés, G, Monath, TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of arbovirus in Argentina. Flaviviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae. In: Travassos da Rosa A, Vasconcelos, PFC, Travassos da Rosa, JFS, editor. An overview of arbovirology in Brasil and neighboring countries. Belem, Brazil: Instituto Evandro Chagas; 1998. p. 114-34.
43. Rodrigues SG, Nunes MR, Casseb SM, Prazeres AS, Rodrigues DS, Silva MO, et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. *J Gen Virol*. 2010 Oct;91(Pt 10):2420-7.
44. Charrel RN, Levy N, Tesh RB, Chandler LJ. Use of base excision sequence scanning for detection of genetic variations in St. Louis encephalitis virus isolates. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1935-40.
45. Johnson AJ, Noga AJ, Kosoy O, Lanciotti RS, Johnson AA, Biggerstaff BJ. Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 May;12(5):566-74.
46. Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000 Nov;2(13):1643-9.

47. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil TRAVASSOS da ROSA, APA; VASCONCELOS, PFC; TRAVASSOS da ROSA, JFS An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute; 1998. p. 72-99.
48. Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TL, Pereira LE. Isolation of St. Louis encephalitis virus in south Brazil. American Journal of Tropical Medical Hygiene. 1979;28:583-5.
49. Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa AP, Leite OF. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1981 Jan;30(1):145-8.
50. Rocco IM, Santos CL, Bisordi I, Petrella SM, Pereira LE, Souza RP, et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in Sao Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005 Sep-Oct;47(5):281-5.
51. Spinsanti L, et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. J Clin Virol. 2008.
52. Diaz LA, Re V, Almiron WR, Farias A, Vazquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. Emerg Infect Dis. 2006 Nov;12(11):1752-4.
53. Suzuki A, Bisordi I, Lima LBQ, Pereira LE, Souza RP, Petrella SM, et al. Saint Louis Encephalitis virus: high prevalence of antibodies in wild birds, Iguape - São Paulo state, Brazil, 2005-2006 (*abstract*). Journal of the Brazilian Society for Virology. 2006;11(suppl.1):129.

54. Mondini A, Cardeal IL, Lazaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jan;13(1):176-8.
55. Mondini A, Bronzoni RV, Cardeal IL, dos Santos TM, Lazaro E, Nunes SH, et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J Clin Virol*. 2007 Sep;40(1):84-6.
56. Iversson LB, Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Pinto GH, Macedo O. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus na população humana na região do Vale do Ribeira. IV. Inquérito sorológico em escolas residentes no município de Iguape, SP (Brasil). *Revista de Saúde Pública (São Paulo)*. 1983;v.17:423-35.
57. Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, PINHEIRO FP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, et al. Arboviroses isolates in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology form man. An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Evandro Chagas Institute; 1998. p. 19-31.
58. Reina MCFP, Freitas AC, Fernandes FC, Silva JAM, Garcia MHO, Lise MLZ, et al. Investigação de casos de Encefalite Viral de Saint Louis, notificados no município de São José do Rio Preto – SP, agosto de 2006. Nota técnica – Secretária de Estado da Saúde/Coordenadoria de Controles de Doenças/ Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”. 2006.
59. Johnson AJ, Cheshier RC, Cosentino G, Masri HP, Mock V, Oesterle R, et al. Validation of a microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Sep;14(9):1084-93.

60. Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res.* 2003;61:139-83.
61. Monath TP, Nystrom RR, Bailey RE, Calisher CH, Muth DJ. Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis. *J Clin Microbiol.* 1984 Oct;20(4):784-90.
62. Re V, Spinsanti L, Farias A, Diaz A, Vazquez A, Aguilar J, et al. Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-nested PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Jan;26(1):10-5.
63. de Moraes Bronzoni RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol.* 2005 Feb;43(2):696-702.
64. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine.* 2013 Jun 19;30(29):4301-6.
65. Lamers MH, Broekman MM, Boucher CA, Brouwer JT, Burger DM, van Hoek B, et al. Treatment of hepatitis C mono-infection in adults - Dutch national guidelines. *Neth J Med.* 2013 Sep;71(7):377-85.
66. De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Jan;1(1):13-25.
67. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral research.* 2008 Apr;78(1):116-24.
68. Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol.* 2006 Jan-Feb;16(1):37-48.

69. Li Z, Khaliq M, Zhou Z, Post CB, Kuhn RJ, Cushman M. Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins. *J Med Chem.* 2008 Aug 14;51(15):4660-71.
70. Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 8;101(23):8676-81.
71. Lau TS, Li Y, Kameoka M, Ng TB, Wan DC. Suppression of HIV replication using RNA interference against HIV-1 integrase. *FEBS Lett.* 2007 Jul 10;581(17):3253-9.
72. Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):5196-201.
73. Arbuthnot P, Longshaw V, Naidoo T, Weinberg MS. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Hepat.* 2007 Jul;14(7):447-59.
74. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol.* 2003 Jun;21(6):639-44.
75. Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett.* 2003 May 22;543(1-3):51-4.
76. Saleh MC, Van Rij RP, Andino R. RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. *Virus Res.* 2004 Jun 1;102(1):11-7.

77. Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.* 2001;1:34.
78. Zhang Y, Li T, Fu L, Yu C, Li Y, Xu X, et al. Silencing SARS-CoV Spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett.* 2004 Feb 27;560(1-3):141-6.
79. Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, et al. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther.* 2003 Nov;8(5):762-8.
80. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med.* 2005 Jan;11(1):50-5.
81. Chen W, Yan W, Du Q, Fei L, Liu M, Ni Z, et al. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol.* 2004 Jul;78(13):6900-7.
82. Narayanan A, Nogueira ML, Ruyechan WT, Kristie TM. Combinatorial transcription of herpes simplex virus and varicella zoster virus immediate early genes is strictly determined by the cellular coactivator HCF-1. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1369-75.
83. DeSimone RW, Currie KS, Mitchell SA, Darrow JW, Pippin DA. Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2004 Aug;7(5):473-94.
84. Rollas S, Kucukguzel SG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules.* 2007;12(8):1910-39.

85. Gouda MA, Berghot MA, Abd El-Ghani GE, Khalil AM. Synthesis and antimicrobial activities of some new thiazole and pyrazole derivatives based on 4,5,6,7-tetrahydrobenzothiophene moiety. *Eur J Med Chem.* 2010 Apr;45(4):1338-45.
86. Bharti SK, Nath G, Tilak R, Singh SK. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *Eur J Med Chem.* 2010 Feb;45(2):651-60.
87. Giri RS, Thaker HM, Giordano T, Williams J, Rogers D, Sudersanam V, et al. Design, synthesis and characterization of novel 2-(2,4-disubstituted-thiazole-5-yl)-3-aryl-3H-quinazoline-4-one derivatives as inhibitors of NF-kappaB and AP-1 mediated transcription activation and as potential anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem.* 2009 May;44(5):2184-9.
88. Shiradkar M, Suresh Kumar GV, Dasari V, Tatikonda S, Akula KC, Shah R. Clubbed triazoles: a novel approach to antitubercular drugs. *Eur J Med Chem.* 2007 Jun;42(6):807-16.
89. Tapia RA, Alegria L, Pessoa CD, Salas C, Cortes MJ, Valderrama JA, et al. Synthesis and antiprotozoal activity of naphthofuranquinones and naphthothiophenequinones containing a fused thiazole ring. *Bioorg Med Chem.* 2003 May 15;11(10):2175-82.
90. Beraldo H, Gambino D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev Med Chem.* 2004 Jan;4(1):31-9.
91. Figueiredo LT. [The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae* families]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1990 Jan-Mar;23(1):13-8.

92. FIELDS BN. *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Press; 1998.
93. Lennette DA. General principles for Laboratory Diagnosis of Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, editors. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*. Washington: American Public Health Association; 1995.
94. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
95. Maiti P, Lomakin A, Benedek GB, Bitan G. Despite its role in assembly, methionine 35 is not necessary for amyloid beta-protein toxicity. *Journal of neurochemistry*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jun;113(5):1252-62.
96. Lennette DA. General principles for Laboratory Diagnosis of Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. Seventh Edition ed. Washington: American Public Health Association; 1995. p. 3-26.
97. Reed LJ, Muench, H. A. A simple method of estimating fifty percent end points. *Journal of Hygiene*. 1938;27:493-7.
98. Carpenter JW. *Formulário de Animais Exóticos*. Norte-Americana E, editor. São Paulo: Ed. MedVet; 2010.
99. Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RG, Faria PC, Nosedá MD, Duarte ME, et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res*. 2005 Jun;66(2-3):103-10.

100. Zhang XG, Mason PW, Dubovi EJ, Xu X, Bourne N, Renshaw RW, et al. Antiviral activity of geneticin against dengue virus. *Antiviral Res.* 2009 Jul;83(1):21-7.
101. Tam RC, Lau JY, Hong Z. Mechanisms of action of ribavirin in antiviral therapies. *Antivir Chem Chemother.* 2001 Sep;12(5):261-72.
102. Julander JG. Experimental therapies for yellow fever. *Antiviral Res.* 2013 Feb;97(2):169-79.
103. Yeh LT, Nguyen M, Dadgostari S, Bu W, Lin CC. LC-MS/MS method for simultaneous determination of viraquine and ribavirin levels in monkey red blood cells. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 Feb 19;43(3):1057-64.
104. Gabrielsen B, Kirsi JJ, Kwong CD, Carter DA, Krauth CA, Hanna LK, et al. In vitro and in vivo antiviral (RNA) evaluation of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase inhibitors and analogues including 6-azauridine-5'-(ethyl methoxyalaninyl) phosphate (a5'-monophosphate prodrug). *Antiviral chemistry & chemotherapy.* 1994;5(4):209-20.
105. Gu B, Mason P, Wang L, Norton P, Bourne N, Moriarty R, et al. Antiviral profiles of novel iminocyclitol compounds against bovine viral diarrhoea virus, West Nile virus, dengue virus and hepatitis B virus. *Antivir Chem Chemother.* 2007;18(1):49-59.
106. Puig-Basagoiti F, Tilgner M, Forshey BM, Philpott SM, Espina NG, Wentworth DE, et al. Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1320-9.
107. Ojwang JO, Ali S, Smee DF, Morrey JD, Shimasaki CD, Sidwell RW. Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family. *Antiviral Res.* 2005 Nov;68(2):49-55.

108. De Meyer N, Van Hoof L, Pandey HK, Mishra L, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, et al. Antiviral activity of synthetic 3-methoxyflavones. *J Chemother.* 1989 Jul;1(4 Suppl):1082-4.
109. Hu JM, Hsiung GD. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. *Antiviral Res.* 1989 Jun-Jul;11(5-6):217-32.
110. Nardone RM. An overview of the scientist's responsibilities: comments by a scientist. *In Vitro.* 1977 Oct;13(10):696-711.
111. Bauer DJ. Monocyclic thiosemicarbazones as antiviral agents. *Ann N Y Acad Sci.* 1965 Jul 30;130(1):105-9.
112. Bauer DJ, St Vincent L, Kempe CH, Young PA, Downie AW. Prophylaxis of smallpox with methisazone. *Am J Epidemiol.* 1969 Aug;90(2):130-45.
113. Bauer DJ, Stvincent L, Kempe CH, Downie AW. Prophylactic Treatment of Small Pox Contacts with N-Methylisatin Beta-Thiosemicarbazone (Compound 33t57, Marboran). *Lancet.* 1963 Sep 7;2(7306):494-6.
114. Shipman C, Jr., Smith SH, Drach JC, Klayman DL. Thiosemicarbazones of 2-acetylpyridine, 2-acetylquinoline, 1-acetylisquinoline, and related compounds as inhibitors of herpes simplex virus in vitro and in a cutaneous herpes guinea pig model. *Antiviral Res.* 1986 Jul;6(4):197-222.
115. Elton NW, Romero A, Trejos A. Clinical pathology of yellow fever. *Am J Clin Pathol.* 1955 Feb;25(2):135-46.
116. Kerr JA. Letter: Liver pathology in yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1973;67(6):882.

117. Hudson NP. The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: III. Comparison with the Pathology of Yellow Fever in Man. *Am J Pathol.* 1928 Sep;4(5):419-30 9.
118. Monath TP. Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. *Rev Infect Dis.* 1987 Jan-Feb;9(1):165-75.
119. Smetana HF. The histopathology of experimental yellow fever. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med.* 1962;335:411-27.
120. Hudson NP. The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus: II. Microscopic Pathology. *Am J Pathol.* 1928 Sep;4(5):407-18.
121. Sbrana E, Xiao SY, Popov VL, Newman PC, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) III. Clinical laboratory values. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jun;74(6):1084-9.
122. Groot H, Riberiro RB. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bull World Health Organ.* 1962;27:699-707.
123. Camacho LA, Freire Mda S, Leal Mda L, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saude Publica.* 2004 Oct;38(5):671-8.