

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ADRIANO LARA ZUZA

**ASTRÓCITOS SÃO RESISTENTES À INFECÇÃO *IN VITRO* PELO VÍRUS DA
ENCEFALITE DE SAINT LOUIS:
ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E ASTROGLIOSE**

UBERLÂNDIA

2014

ADRIANO LARA ZUZA

**ASTRÓCITOS SÃO RESISTENTES À INFECÇÃO *IN VITRO* PELO VÍRUS DA
ENCEFALITE DE SAINT LOUIS:
ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E ASTROGLIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Renata Graciele Zanon

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Helena Chávez

UBERLÂNDIA

2014

Inserir Ficha catalográfica no verso da folha de rosto.
Inserir Ata da defesa antes da epígrafe.

Dedico este trabalho Àquele que é o autor e consumidor da Vida. Aquele por meio do qual, pelo qual e para o qual todas as coisas foram feitas. Quanto mais me aprofundo no conhecimento da Ciência mais Te conheço, mais maravilhado e grato sou a Ti por essa grandiosidade assombrosa que é a Natureza, pela oportunidade de aprender e exercer domínio sobre a obra das Suas mãos.

A minha esposa Yara, minha filha Elisa. Muito obrigado, minhas queridas, por todo seu amor, carinho, cuidado, compreensão, paciência e ajuda. Sem este apoio esta conquista seria muito menos prazerosa e sem sentido. Este trabalho é nosso.

Amo vocês.

Aos meus pais e sogros, irmã, cunhados, avós e todos os meus familiares que tanto me apoiaram e supriram a minha casa com tudo o que era necessário enquanto eu me dedicava a este trabalho. Vocês foram essenciais neste processo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Renata, e co-orientadora, Prof^a. Juliana. Por terem sido ousadas ao encarar este desafio comigo mesmo sabendo que teríamos apenas metade do tempo para desenvolvê-lo e da minha escassa experiência neste campo. Obrigado por várias vezes terem literalmente posto a “mão na massa” para me ensinar com tanta dedicação e cuidado. Obrigado pelas inúmeras horas agradáveis em sua companhia, as refeições juntos, as conversas, por me deixar fazer parte da sua vida durante este tempo, por me dar inúmeras oportunidades, por ser tão compreensiva quando eu falhava, por ser tão brilhantemente adaptável às inúmeras reviravoltas em nossas vidas durante esta trajetória. Obrigado pelo seu exemplo de vida, de caráter, de ensino e de pesquisa.

A coordenação do PPGBC, representado na pessoa do professor Paulo Rogério de Faria, secretaria e todos os demais professores, técnicos e funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU.

Agradeço também aos meus colegas de mestrado e alunos do laboratório de cultura celular, principalmente, minha colega Nayara pela ajuda, ensino e companheirismo durante esses dois anos.

Ao Héber e Lorraine, agora meus amigos, por me ensinar com dedicação às práticas do laboratório e compartilhar seus conhecimentos.

A Thelma, por me ensinar a fazer PCR e pelas boas conversas.

Ao Guilherme, Loiane e demais colegas do laboratório de virologia da UFU por me receberem tão bem.

Ao Prof. Tadeu por me receber no laboratório de virologia da USPRP para fazer parte dos meus experimentos. A Soraya, Marília por me receberem tão bem, me fazendo sentir em casa em Ribeirão Preto, por me ajudarem tanto com ensino, informação e materiais fundamentais para a conclusão desta pesquisa, bem como a todos os demais colegas do laboratório de virologia do Prof. Tadeu.

A todos os demais envolvidos neste projeto de maneira direta, indireta e até mesmo pontual, mesmo aos que simplesmente emprestaram um insumo ou equipamento. Sem sua ajuda esta pesquisa não aconteceria.

“[Eu] Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.”

“Cada vez que você faz uma opção está transformando sua essência em alguma coisa um pouco diferente do que era antes.”

“Mera mudança não é crescimento. Crescimento é a síntese de mudança e continuidade, e onde não há continuidade não há crescimento.”

C. S. Lewis

RESUMO

O vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), um flavivírus transmitido a humanos através da picada de mosquitos *Culex*, é o agente causador da Encefalite de Saint Louis (SLE), uma doença que pode levar a encefalite de gravidade variada, principalmente em idosos, com taxa de mortalidade de aproximadamente 17%. Para alcançar o sistema nervoso central (CNS) pela corrente sanguínea, o patógeno deve atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), formada por células endoteliais e astrócitos. Os astrócitos são o tipo celular da glia mais presente no CNS, com função de manutenção da homeostase, neuroinflamação e respostas imunes do tecido neural. Embora passíveis de infecção por diversos flavivirus, a infectividade de astrócitos por SLEV e as alterações celulares decorrentes desta infecção carecem estudos. Por sua função estratégica, fundamental para o funcionamento do CNS, os astrócitos foram investigados quanto a ativação e alterações morfológicas, indução de resposta imunológica via MHC-I e indução de apoptose pela ativação de caspase-3 pós-infecção por SLEV. A titulação viral comparativa de amostras pelos métodos de formação de placas (PFU) e sal de MTT revelou que em ambas as técnicas os resultados foram semelhantes. Quando infectados por SLEV, células VERO apresentaram maiores citotoxicidade e mortalidade do que astrócitos. Além disso, o contato com o flavivirus desencadeou ativação imune astrocitária marcada por aumento de MHC-I e astrogliose com intensa expressão de GFAP, aumento no número e comprimento dos prolongamentos citoplasmáticos. Quando expostos a concentrações virais crescentes, foi observado aumento proporcional na expressão de caspase-3, também marcado pela destruição da membrana nuclear. A imunomarcagem com anticorpos anti-SLEV revelou que os vírus ocupam uma posição perinuclear durante o processo de replicação. A grande resistência dos astrócitos ao SLEV sugere que outros mecanismos de infecção, como a quebra da barreira hematoencefálica possa estar associada ao desenvolvimento de SLE e que o papel do astrócitos na SLE também esteja relacionado à infecção viral crônica.

Palavras-chave: vírus da encefalite de Saint Louis; astrócito; infecção; astrogliose; cultura celular.

ABSTRACT

Saint Louis Encephalitis Virus (SLEV) is a flavivirus that infects humans through *Culex* mosquito bite. It causes Saint Louis Encephalitis (SLE), a disease that affects mainly the elderly with a mortality rate of 17% and various severity clinical presentations. In order to reach the central nervous system (CNS) from circulating blood the pathogen must cross a barrier formed by endothelial cells and astrocytes, the blood-brain-barrier (BBB). Astrocytes are the most common glial cell type in CNS, their role is to keep neural tissue homeostasis, control neuroinflammation and immune response. Although astrocytes can be infected by flavivirus, there are few studies to evaluate its infection and cell alterations post SLEV exposure. For astrocyte plays an essential role in CNS functioning, they were investigated for morphologic alterations and activation (astrogliosis), immunological response via MHC-I and apoptosis induction via caspase-3 activation post-infection. A comparative study using plaque forming units (PFU) and MTT salt assay was performed to determine viral titer revealing that both methods can be used to access viral titres of a sample with similar results. VERO cells shown higher cytotoxicity and mortality rates than astrocytes when infected with SLEV. Besides, flaviviral exposure unleashed astrocyte immune response marked by raise in MHC-I expression and astrogliosis, characterized by intense GFAP expression, and increase in number and length of cytoplasmic processes. When exposed to growing viral concentrations, it has been observed a proportional increase of caspase-3 expression, also showing nuclear envelope destruction. Immune staining with anti-SLEV antibody revealed that the virus displayed a perinuclear location during the replication process. The great SLEV resistance of astrocytes suggests that other infection mechanisms, as BBB breakdown must be associated in the neuroinvasive form of SLEV infection. Also astrocyte might play a role in chronic infection of CNS.

Keywords: Saint Louis encephalitis virus; astrocyte; infection; astrogliosis; cell culture.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplo de formação de placas em um ensaio de PFU.	35
FIGURA 2: Gráfico mostrando a leitura de absorbâncias (eixo y) de MTT em células VERO em diferentes concentrações virais (eixo x).	36
FIGURA 3: Gráfico mostrando a leitura de absorbâncias (eixo y) de MTT em astrócitos em diferentes concentrações virais (eixo x).	36
FIGURA 4: Taxa de mortalidade de células VERO frente à infecção por SLEV em diferentes concentrações comparada às células VERO não infectadas.	37
FIGURA 5: Taxa de mortalidade de astrócitos frente à infecção por SLEV em diferentes concentrações comparado aos astrócitos não infectados.	38
FIGURA 6: Fragmento genômico amplificado de vírus da encefalite de Saint Louis (232pb) em amostra de linhagem celular VERO (A) e astrócitos (B).	39
FIGURA 7: Imunofluorescência em culturas de astrócitos após 6 dias de infecção por SLEV e OROV.	43
FIGURA 8: Imunomarcção anti-caspase-3 ativada em astrócitos não infectados e infectados por diluições seriadas de SLEV e OROV 1%.	44
FIGURA 9: Análise por densitometria de pixels da expressão de MHC-I em astrócitos não infectados por SLEV e infectados em diluições variadas.	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relação de anticorpos primários utilizados para avaliar as interações SLEVastrócito por imunocitoquímica.	32
--	----

LISTA DE SIGLAS

BBB – Barreira hematoencefálica
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BSA – Albumina do Soro Bovino
C – Proteína do Capsídeo viral
C6/36 – Linhagem celular de abdome de mosquito *Aedes albopictus*
CASP-3 – Caspase 3
CNTF – Fator Ciliar Neurotrófico
CPE – Efeito citopático
CXCR4 – Receptor de Quimiocina CXC do tipo 4
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DENV – Vírus da dengue
DEPC – Dietilpirocarbonato
DMEM – Meio de cultura celular de Eagle modificado por Dulbeco
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DTT – Ditionitreitol
E – Glicoproteína do Envelope viral
EEE – Encefalite Equina Oriental
EEO – Encefalite Equina Ocidental
ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
GFAP – Proteína Acídica Fibrilar Glial
GLAST – Transportador Aspirador de Glutamato
GLT-1 – Transportador de Glutamato Tipo 1
GS – Glutamina Sintetase
HGF – Fator de Crescimento de Hepatócitos
HSV – Vírus da herpes simples
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular Tipo 1
IFN – Interferon
IL – Interleucina
IP – Proteína Indutora de Interferon
JEV – Vírus da encefalite japonesa
L-15 – Meio de cultura de células de Leibovitz
MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócito Tipo 1
M – Glicoproteína da Membrana viral

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIAF – Fluido Ascítico Imune de Camundongo
MMP – Metaloproteinase
MTT – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]
NGF – Fator de Crescimento Nervoso
NS – Proteínas não estruturais
OROV – Oropouche vírus
PBS – Solução de tampão fosfato
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PFU – Ensaio de formação de placas
PRR – Receptor de Reconhecimento de Patógenos
prM – Glicoproteína pré-Membrana
qPCR – PCR quantitativa
RANTES – Regulado pela Ativação, Normalmente Expresso e Secretado por linfócitos T
RdRp – RNA dependente de RNA-polimerase
RER – Retículo endoplasmático rugoso
RIG – Receptor semelhante ao gene induzível pelo ácido retinóico
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécie Reativa de Oxigênio
RPM – Rotações por minuto
RT-PCR – PRC de transcrição reversa
SFB – Soro Fetal Bovino
SLE – Encefalite de Saint Louis
SLEV – Vírus da encefalite de Saint Louis
SNC – Sistema nervoso central
TBE – Solução tampão de TRIS-borato-EDTA
TLR – Receptor Toll-Like
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TRPS – *tunable resistive pulse sensing*
VCAM 1 – Proteína de Adesão de Célula Vascular Tipo 1
VERO – Linhagem de células epiteliais de rim de macaco verde africano, *Chlorocebus* sp.
vRNA – RNA viral
WNV – Vírus do oeste do Nilo ou Vírus do Nilo ocidental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	<i>Produção do estoque viral</i>	<i>25</i>
4.2	<i>Titulação do estoque viral.....</i>	<i>25</i>
4.3	<i>Cultura primária de astrócitos.....</i>	<i>27</i>
4.4	<i>Teste de citotoxicidade de astrócitos ao SLEV (CC₅₀%).....</i>	<i>28</i>
4.5	<i>Extração de RNA viral.....</i>	<i>29</i>
4.6	<i>Transcrição reversa (RT) para obtenção de cDNA</i>	<i>30</i>
4.7	<i>Reação de PCR para detecção do SLEV</i>	<i>31</i>
4.8	<i>Imunocitoquímica</i>	<i>31</i>
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEXO.....	65
	APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), membro do complexo JE, cujos principais representantes são o vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus do oeste do Nilo (WNV), é um RNA vírus (MONATH et al., 2012) que pode ser transmitido a humanos através da picada de algumas espécies de mosquitos, principalmente *Culex* spp. (TRENT et al., 1980; MONATH; TSAI, 2002; RODRIGUES et al., 2010). O vírus encontra-se amplamente distribuído pelas américas (KRAMER; CHANDLER, 2001; MONDINI et al., 2007; BAILLIE et al., 2008; MAY et al., 2008; SPINSANTI et al., 2008; AUGUSTE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010) e, uma vez inoculado em indivíduos que apresentam predisposição herdada ou adquirida (SEVJAR et al., 2004; MONATH et al., 2012; SHELLAN et al., 1998; LIM et al., 2008), pode infectar o sistema nervoso central (CNS) causando encefalite.

Um dos processos críticos da etiopatogenia da encefalite de Saint Louis (SLE) é a invasão do CNS (MONATH et al., 1983; GARDNER; REYES, 1980; SAMUEL et al., 2007b; LIOU et al., 1998; VERMA et al., 2009; ROE et al., 2012) onde o SLEV deve atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) composta por endoteliócitos e astrócitos. O interesse em se investigar a interação SLEV-astrócito é devido a multifuncionalidade desta célula que compõe a BBB controlando, juntamente com o endotélio, a passagem de moléculas ao CNS, bem como, sua participação nos processos de inflamação e resposta imune do sistema nervoso aos agentes infecciosos, estando bem envolvidos com a neurodegeneração e plasticidade neuronal (CHEN et al., 2010; FURR; MARRIOTT, 2012; RAO et al., 2012; RASLEY et al., 2004; CHAUHAN et al., 2010; KAWAI; AKIRA, 2008; YONEYAMA; FUGITA, 2010; BI et al., 1995). Uma vez que até o momento não existe vacina nem medicamento eficazes no tratamento da SLE, o objetivo deste trabalho foi estudar, *in vitro*, a interação SLEV-astrócito de forma a avaliar a susceptibilidade do astrócito à infecção por SLEV, bem como o grau de resistência destas células à infecção viral, comparando-o com outra linhagem de células de vertebrado (VERO) através da expressão de GFAP, caspase-3 clivada, ativação de resposta imunológica via MHC-I e as alterações morfológicas experimentadas pelo astrócito decorrentes da infecção por SLEV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da encefalite de Saint Louis, ou SLEV, tem sua origem na América Tropical, no fim do século XIX (BAILLIE et al., 2008). Ele é o causador da encefalite de Saint Louis, uma patologia descrita clinicamente na década de 1920 (apud MONATH; TSAI, 2002) e caracterizada como doença viral em 1931 (apud MONATH; TSAI, 2002). Pertencente à família *Flaviviridae*, este *flavivirus* encontra-se agrupado, de acordo com testes de neutralização antigênica, no complexo JE, cujo principal integrante é o vírus da encefalite japonesa (JEV), dentre outros como o vírus do oeste do Nilo (WNV). A família *Flaviviridae* possui grande relevância médica sendo a principal família de vírus a ser transmitida por artrópodes vetores como mosquitos e carrapatos (MONATH; TSAI, 2002).

Com cerca de 40nm de diâmetro o SLEV apresenta um nucleocapsídeo protéico com formato icosaédrico, envolto por um envelope constituído por uma bicamada lipídica (MONATH; TSAI, 2002; MUKHOPADHYAY et al., 2005). Nesta bicamada encontram-se proteínas, cujas principais são as glicoproteínas E e glicoproteína M. A glicoproteína M possui uma porção pré-M, em vírus imaturos, que é clivada antes do processo de brotamento do vírus recém-formado para o exterior celular de forma que a proteína M seja capaz de exercer sua função no vírus maduro (MUKHOPADHYAY et al., 2005). O genoma viral é composto por uma fita simples de RNA com cerca de 11kb e cauda poli (A) na extremidade 3'. Este genoma codifica 10 proteínas, três estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). As proteínas ditas estruturais irão fazer parte da estrutura do vírus maduro, exceto a proteína pré-M, que obrigatoriamente deve ser clivada para dar origem a sua forma funcional, a proteína M no vírus maduro. Já as proteínas não estruturais são assim denominadas por possuírem função no processo de replicação viral não integrando a estrutura do vírus maduro (MONATH; TSAI, 2002; MUKHOPADHYAY et al., 2005).

A ordem como as regiões codificantes do genoma viral são distribuídas ao longo do filamento de RNA irá caracterizar as diversas linhagens virais. Até o momento foram descritas oito linhagens de SLEV com características distintas (KRAMER; CHANDLER, 2001; BAILLIE et al., 2008; MAY et al., 2008; AUGUSTE et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010). Por exemplo, a linhagem I, encontrada no oeste dos EUA é caracterizada por apresentar menor neurovirulência, menor taxa de mortalidade e possuir caráter de transmissão endêmico, sendo transmitida por mosquitos *Culex tarsalis* (TRENT et al., 1980; MONATH; TSAI, 2002). A linhagem II é observada a leste do rio Mississippi nos EUA e apresenta maior neurovirulência em camundongos e macacos Rhesus, maior viremia em pardais e maior taxa

de transmissão por mosquitos vetores, sendo transmitidas por mosquitos *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* (MONATH; TSAI, 2002). A linhagem III do SLEV tem sido descrita na literatura como presente no Brasil (MONDINI et al., 2007) e Argentina (SPINSANTI et al., 2008).

No Brasil existem relatos de circulação do SLEV na Amazônia (linhagem V) (RODRIGUES et al., 2010), Pantanal e diversas cidades do país. Figueiredo et al. (1986) e Romano-Lieber e Iverson (2000) relataram a presença de anticorpos anti-SLEV nas populações de Ribeirão-Preto e Vale do Ribeira, respectivamente. Rocco et al. (2005) relataram um caso no município de São Pedro, SP de uma paciente com suspeita de dengue que foi após testes diagnosticada com SLEV. Ainda no estado de São Paulo, Mondini et al. (2007) relataram seis casos confirmados de infecção por SLEV no município de São José do Rio Preto, no interior do estado.

O ciclo de transmissão da SLE se inicia quando um mosquito pica um animal reservatório. Tem sido descritos como reservatórios naturais do SLEV mamíferos de diversas espécies e algumas aves (AUGUSTE et al., 2009). Por algumas espécies de aves possuírem hábitos migratórios chegando a voar milhares de quilômetros, elas têm sido apontadas como as principais propagadoras do vírus, sendo que este já se encontra disseminado por todo o continente americano (RODRIGUES et al., 2010; MONATH, 2012).

Ao picar um animal infectado o mosquito vetor contrai o vírus e ao picar um humano, os vírus podem ser transmitidos pela saliva do mosquito alcançando o tecido subcutâneo do indivíduo, onde se inicia a replicação viral. A replicação viral se inicia quando o vírus se liga aos receptores de sulfato de heparana (MONATH; TSAI, 2002) na face externa da membrana plasmática do hospedeiro. Isto permite que o vírus seja adsorvido através da membrana celular sendo endocitado em vesículas recobertas por clatrina (MONATH; TSAI, 2002). No interior das vesículas os nucleocapsídeos virais são liberados e pelo pH ácido no interior do lisossomo a proteína E sofre uma alteração na sua conformação que leva à fusão das membranas viral e lisossomal liberando o genoma viral no citoplasma (MUKHOPADHYAY et al., 2005). No citoplasma celular o RNA viral é replicado e traduzido. Após a montagem no retículo endoplasmático rugoso, os vírus são transportados pelo complexo de Golgi, de onde partem para a membrana plasmática onde ocorre o brotamento das vesículas carregadas de vírus maduros (MUKHOPADHYAY et al., 2005). Este processo de replicação se dá em diversos tipos celulares do organismo como células do tecido conjuntivo, glândulas exócrinas

e endócrinas, células reticuloendoteliais e tecido musculoesquelético (LUBY et al., 1980; SIIRIN et al., 2007; MONATH, 2012).

Uma vez que os vírus alcancem os vasos linfáticos eles são, então, disseminados para os diversos órgãos e sistemas. Siirin et al. (2007) demonstraram a presença de vírus em amostras de, pulmões, cérebro, rins e na urina de hamsters infectados. Luby et al. (1980) demonstraram a presença de vírus na urina de pacientes infectados. A presença de vírus em cada órgão ou sistema poderá resultar em aparecimento de sintomatologia ou sinais clínicos de infecção da referida região. Por exemplo, embora a presença de vírus no trato urinário não esteja relacionada à significativa lesão renal durante a infecção, alguns pacientes podem desenvolver piúria e proteinúria com manifestações clínicas de urgência e incontinência urinária (MONATH et al., 2012).

Estima-se que de cada 800 crianças infectadas pelo SLEV apenas 1 irá, de fato, desenvolver a forma neuroinvasiva da doença (MONATH, 2012). Entretanto na população idosa o índice de infecção inaparente/aparente chega a 85/1, sendo que pacientes portadores de comorbidades também apresentam maior chance de desenvolver SLE (MONATH; TSAI, 1987). Sevjar et al. (2004) afirmaram que pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose, diabetes mellitus, etilistas, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças vasculares cerebrais apresentam maior risco de desenvolver SLE. Segundo Monath et al. (2012), pacientes com comprometimento da barreira hematoencefálica, seja por imaturidade, ruptura traumática ou infecções simultâneas, também apresentam risco aumentado para SLE. Shellan et al. (1998) atribuiu um maior risco de infecção a fatores genéticos, o que também foi defendido por Lim et al. (2008) que cita a homozigose de CCR5Delta32 como fator predisponente para infecção sintomática por WNV em humanos. Por sua vez, Sevjar et al. (2004) afirmaram que um menor risco de neuroinfecção pode estar associado à imunidade adquirida da doença questionando se poderia haver também imunidade cruzada por infecção prévia pelo vírus da dengue. Aparentemente o fator genético é importante na susceptibilidade à infecção, pois a expressão da doença é resultado das respostas inata e adaptativa do hospedeiro contra a replicação viral. Além disso a invasão do CNS parece estar diretamente ligada à replicação viral em sítios extraneurais e aos níveis de viremia. No seu relatório parcial, publicado em 23 de agosto de 2014, o *Centers for Disease Control* (CDC) reportou que em 2012 foram notificados apenas 3 casos de infecção por SLEV, todos no estado do Texas, em adultos entre 40-60 anos. Apenas um dos 3 casos apresentou a forma neuroinvasiva necessitando hospitalização. Não houveram óbitos naquele

período e até a data da publicação haviam sido reportados 3 novos casos da doença, um em 2013 e dois em 2014 (CDC Morbidity and Mortality Weekly Report, 2014).

Conforme o vírus se replica atingindo outros órgãos e tecidos, diversos sintomas surgem, de acordo com a região acometida pela infecção. Os sintomas podem variar desde manifestações sintomáticas inespecíficas e autolimitadas, semelhantes à influenza, a manifestações graves do CNS, caracterizando a forma neuroinvasiva da doença. Dentre as manifestações clínicas mais comuns encontram-se mal estar, febre, dores de cabeça, mialgia, tosse, dor de garganta, dor abdominal, vômitos, diarreia, disúria, urgência e incontinência urinária. Já dentre os sinais e sintomas mais graves, que indicam acometimento do CNS temos a fotofobia, meningismo, dores de cabeça intensas, tremores, ataxia e confusão mental (MONATH et al., 2012). Cerca de 50% dos pacientes com a forma neuroinvasiva da doença apresentam tremores palpebrais, na língua, lábios e nas extremidades, sendo que 25% podem apresentar paralisias, geralmente unilaterais, de nervos cranianos. Quinze por cento dos pacientes podem evoluir para coma profundo. Algumas manifestações menos frequentes de SLE incluem movimentos mioclônicos involuntários, nistagmo e alterações na marcha (MONATH et al., 2012).

A encefalite de Saint Louis é uma doença de baixa frequência e de difícil diagnóstico visto que suas manifestações clínicas podem se assemelhar a diversas outras doenças, como episódios isquêmicos transitórios, insolação, intoxicação por drogas, encefalopatia metabólica, distúrbios hidroeletrólíticos, além de suas características clínicas poderem se sobrepor à de outras infecções como enterovirose, EEE, EEO, HSV, doença da arranhadura do gato, meningites por micoplasma, bactérias ou fungos, meningites bacterianas parcialmente tratadas, leptospirose e encefalite por *Listeria* (MONATH, 2012; MONATH; TSAI, 2002). E mesmo durante picos febris a viremia no sangue e liquor é limitada de forma que ambos precisam ser testados para assegurar maior sensibilidade nos exames e um diagnóstico acurado (MONATH, 2012). Esta dificuldade diagnóstica tem levado vários pesquisadores a pesquisar novas soluções e métodos que assegurem diagnósticos mais rápidos e precisos (MARTIN et al., 2004; PUGACHEV et al., 2004; JOHNSON et al., 2005; ROBERSON et al., 2007; CHÁVEZ et al., 2013). Apesar de todas as pesquisas com o vírus, até o momento não existe vacina nem tratamento para a SLE.

Um dos processos críticos da etiopatogenia da SLE é a invasão viral do CNS através da barreira hematoencefálica. A BBB é constituída por células endoteliais revestidas por uma membrana basal e prolongamentos astrocitários, que circundam completamente os vasos

sanguíneos que aferem ao CNS regulando a passagem de substâncias a este sistema (SUEN et al., 2014).

Na BBB, diferente de outras regiões do organismo, o endotélio vascular não apresenta poros e suas células estão unidas por inúmeras junções oclusivas que impedem a passagem de diversas substâncias incluindo proteínas, diversos fármacos e quase toda água para o CNS, sendo essencial para a manutenção do volume e controle da concentração tecidual de substâncias como íons potássio, glutamato e ácido γ -aminobutírico, que compõem o microambiente do CNS (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Assim sendo, todo transporte de substâncias através da BBB depende da presença de sistemas transportadores específicos de forma que qualquer substância que não possua um receptor específico, como alguns medicamentos, são incapazes de penetrar a BBB.

Segundo Monath et al. (1983) SLEV poderiam infectar o CNS através dos nervos olfatórios que não apresentam proteção da BBB. Por sua vez, Gardner e Reyes (1980) e Samuel et al. (2007b) afirmaram que a infecção do CNS pode se dar por transporte axonal retrógrado, o que explicaria a mielite transversa apresentada por alguns pacientes. A passagem de vírus pela BBB também pode ocorrer por endocitose (LIOU et al., 1998) onde SLEVs passam “através” dos endoteliócitos e astrócitos ou por destruição dos complexos juncionais destas células. Em WNV a destruição dos complexos juncionais pela MMP-1 e MMP-3 estão relacionadas à infecção viral nas primeiras 24 horas e de MMP-9 cerca de 3 a 4 dias pós-infecção (VERMA et al., 2009; ROE et al., 2012).

Os astrócitos são o principal componente glial do CNS sendo responsáveis por manter a homeostase para o perfeito funcionamento neuronal principalmente através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, armazenamento de glicogênio e desintoxicação por metais e xenobióticos (CHEN et al., 2010; FURR; MARRIOT, 2012; RAO et al, 2012). Estas células também controlam a permeabilidade da BBB e a progressão do dano inflamatório, sendo responsáveis, juntamente com a microglia, por iniciar a migração leucocitária e pela expressão de sintase de óxido nítrico (BI et al., 1995). Além disso, os astrócitos são conhecidos pelo seu papel efetor da resposta imunológica pela expressão de MHC-I e II e produção de IFN antiviral-I via PRRs, IL-6, TNF- α e IL-1 β (CHAUHAN et al., 2010; KAWAI; AKIRA, 2008; YONEYAMA; FUGITA, 2010). O conjunto de alterações estruturais e metabólicas de resposta dos astrócitos a um dano tecidual e não apenas a interferência que eles exercem na inflamação e imunidade dá-se o nome de astrogliose.

Ao entrar em contato com vírus na BBB os astrócitos ativam a resposta imunológica inata e adaptativa com liberação de citocinas e fatores quimiotáticos que irão mobilizar as células de defesa oriundas da corrente circulatória. Segundo Chen et al. (2010) astrócitos ativados produzem IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-18, RANTES, IP-10, GFAP, GLAST, GLT-1, NGF, CNTF e BDNF. Mishra et al. (2007) também citaram a produção de HGF, ceruloplasmina, GS, vimentina e ROS por astrócitos. Dentre as células, que migram ao CNS, estão os linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ através da indução quimiotática provocada pela liberação de CXCR4 (MCCANDLESS et al., 2008), TLR3 (WANG et al., 2004), MHC-I, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (ABRAHAM; MANJUNATH, 2006). A resposta imunológica humoral também desempenha um fator extremamente importante na proteção de infecções virais através da produção de anticorpos neutralizadores nas suas formas adquiridas ou por imunidade cruzada, conforme citado anteriormente. A astrogliose e, consequente, permeabilização da BBB permitindo a entrada de leucócitos, altera a homeostase do CNS podendo acarretar alterações do funcionamento do tecido nervoso e maior dano cerebral que a própria infecção (BAUER et al., 1995; STOLL; JANDER, 1999; DONG; BENVENISTE, 2001; FISCHER; REICHMAN, 2001; FURR; MARRIOTT, 2012).

Estudando a resposta celular frente ao SLEV podemos começar a entender como o vírus chega ao CNS e dar bases para futuras propostas de como podemos bloquear essa chegada que muitas vezes resulta em morte do hospedeiro. Desta forma, os objetivos deste trabalho são investigar a interação SLEV-astrócitos *in vitro* através de cultura primária. Comparar com células VERO a susceptibilidade e o grau de resistência do astrócitos à infecção viral. Avaliar o fenômeno da astrogliose decorrente da infecção por SLEV, bem como a expressão de MHC-I e níveis de apoptose induzidos pela infecção, comparando-os com astrócitos infectados por OROV e células VERO.

3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

Geral:

O objetivo deste trabalho foi estudar a interação SLEV-astrócito de forma a avaliar a susceptibilidade do astrócitos à infecção por SLEV, bem como o grau de resistência destas células à infecção viral, comparando-o com outra linhagem de células de vertebrado (VERO).

Específicos:

Estudar a astrogliose e alterações morfológicas em resposta a diferentes diluições virais;

Estudar a apoptose e a citotoxicidade de astrócitos infectados por SLEV;

Estudar a expressão de MHC-I em astrócitos infectados com diferentes diluições virais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Produção do estoque viral*

Os vírus da encefalite de Saint Louis (BeH 355964) foram produzidos em linhagem contínua de células C6/36, originárias de abdome do mosquito *Aedes albopictus*. As células C6/36 foram cultivadas em meio de cultura celular L-15 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), contendo 5% de soro fetal bovino (SFB, Nutricell, Campinas, BR), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e mantidas a 28°C. Após atingirem 80% de confluência, as células foram inoculadas com uma alíquota de solução viral, em volume de 2mL, em frascos plásticos de 75cm² (Nest Biotechnology CO., Shanghai, China) com meio de cultivo previamente removido. Em seguida, agitou-se a garrafa a cada 15min e, após 1h, foi realizada a reposição do meio L-15. Após período de sete dias ou até surgimento de efeito citopático, as garrafas de cultura foram congeladas a -70°C (ultrafreezer Nuare, Plymouth, MN, USA) e descongeladas imediatamente para que houvesse ruptura da membrana plasmática das células e liberação de vírus que, porventura, ainda não houvessem sido liberados para o meio extracelular, e seu conteúdo foi transferido para um tubo de 15mL. A suspensão foi submetida à centrifugação a 5000 RPM para retirada dos debris celulares. O sobrenadante foi então retirado, aliquotado e armazenado a -70°C, constituindo o estoque viral.

4.2 *Titulação do estoque viral*

O título viral foi obtido através de dois métodos distintos, através de ensaio de formação de placas (PFU, *Plaque Forming Units Assay*), conforme descrito por Burleson *et al.* (1992) e pelo ensaio colorimétrico com sal de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] (MTT), conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991). Assim, seria possível comparar se ambos os métodos produziriam valores semelhantes de título viral para uma determinada amostra, podendo ser usados em trabalhos futuros.

Para titulação por ensaio de formação de placas células VERO foram contadas em câmara de Neubauer, obtendo a concentração de 2×10^5 células/mL. Foram adicionados 12mL de DMEM (Nutricell, Campinas, BR) a 5% de SFB à suspensão contendo células. Em seguida, a suspensão foi distribuída em placas de 24 poços (Nest Biotechnology CO., Shanghai, China), 500µL/poço e incubadas a 37°C (incubadora Nuare, Plymouth, MN, USA). No dia seguinte, após 80% de confluência, o meio das células foi retirado e diluições seriadas na razão 10 da suspensão viral foram adicionadas aos diferentes poços. Estas diluições permaneceram em contato com as células por 1h, sendo agitadas manualmente a cada 15 minutos, à temperatura de 37°C, sendo as placas levemente agitadas a cada 15min.

Quatro poços foram separados para controle: 2 poços para controle viral, no qual foi colocada a suspensão viral pura; 2 poços para controle celular, sendo a suspensão viral de inoculação substituída por meio DMEM incompleto. Em seguida, foi retirado o inóculo (diluições da suspensão viral), e o meio no caso do controle celular, foram adicionados 500µL de meio completo suplementado com 5% de SFB e 1% de metilcelulose (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Procedeu-se a incubação por 6 dias, a 37°C, 5% CO₂ e umidade controlada (incubadora Nuare, Plymouth, MN, USA). Em seguida as placas foram coradas com cristal violeta (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). A metilcelulose permite que o meio de cultura se torne semi-sólido, de forma que as partículas virais adsorvidas na membrana das células em cultura, caso venham a penetrar a célula se replicando e ocasionando a lise celular, não se dispersem pelo meio de cultura. Desta forma, ao serem lisadas as células ocorre a formação de placas, que são evidenciadas pela coloração com cristal violeta, de maneira que elas podem ser individualizadas e contadas para se obter o título viral da solução. O resultado foi expresso em unidades formadoras de placa por mililitro, ou seja, PFU/mL definido pela seguinte fórmula:

$$T.V. = N.P. \times (1/D.V.) \times (1/V.D.)$$

T.V.= Título viral

N.P.: Número de placas contadas na diluição escolhida- última diluição

D.V.: Diluição viral na qual as placas foram contadas

V.D.: Volume usado na inoculação (comum a todas as diluições)

Para a titulação por ensaio colorimétrico com sal de MTT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades (5x10³ células/cavidade, 100 µL/cavidade; Nest Biotechnology CO., Shanghai, China) por 6 dias usando meio DMEM suplementado com 5% de SFB, em estufa de 37°C, 5% CO₂ e umidade controlada. Nos poços controles foram adicionados apenas meio de cultura sem vírus. Os poços sequenciais receberam diluições da solução contendo vírus nas concentrações de 1E-01, 1E-02, 1E-03, 1E-04, 1E-05, 1E-06 e 1E-07. Estas diluições permaneceram em contato com as células por 1h, sendo agitadas manualmente a cada 15 minutos, à temperatura de 37°C, sendo as placas levemente agitadas a cada 15min. Após incubação, todo o meio foi aspirado sendo adicionados 50µL de uma solução de MTT em todas as cavidades. A solução de MTT foi preparada em meio DMEM a 1mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4h nas mesmas condições.

Após o período de incubação, foi retirada a solução de cada cavidade e foram adicionados 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) para solubilizar os cristais de formazana. As placas foram agitadas levemente à temperatura ambiente, por 10min, para que todos os cristais fossem solubilizados. A leitura das placas foi realizada a 540nm (Elx 800, Bio-Tek, Winnosky, VT, USA). A medida das absorbâncias do teste de MTT foi utilizada para o cálculo do título das amostras virais conforme descrito por Reed e Muench (1938). O cálculo detalhado encontra-se descrito no apêndice A.

O sal de MTT, [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium], é um composto hidrossolúvel, de cor amarelo-pálido em solução, e facilmente incorporado por células viáveis, as quais o reduzem em suas mitocôndrias, através das desidrogenases, transformando-o em formazana, um composto de coloração azul escuro, insolúvel em água. A formazana fica armazenada no citoplasma celular, podendo ser solubilizada com agentes específicos como o DMSO. O ensaio colorimétrico do MTT mede a quantidade de formazana formada através de espectrofotometria e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis. Usando essa técnica, podemos calcular o efeito citotóxico resultantes da replicação viral através da variação da atividade mitocondrial (SIEUWERTS et al, 1995). O resultado obtido foi expresso em dose infectante de 50% do tecido em cultura por mililitro ou TCID₅₀/ml, ou seja, a quantidade de vírus por mililitro necessária para infectar e destruir 50% das células em cultura.

Após a obtenção dos títulos virais por PFU e MTT os valores foram submetidos a uma fórmula, baseada na distribuição de Poisson, que permite estabelecer uma correlação entre os valores dos títulos obtidos por cada método, conforme apresentada abaixo (GRAENTZDOERFFER; NEMETZ, 2003):

$$\text{PFU} = \text{MTT} \times 0,69$$

4.3 *Cultura primária de astrócitos*

Foram feitas culturas purificadas de astrócitos através da dissociação do córtex cerebral (MCCARTY; VELLIS, 1980) de camundongos neonatos (1 a 2 dias pós-natal) da linhagem Swiss. Os animais foram induzidos à inconsciência por frio e decapitados para remoção do cérebro. Todos os procedimentos em animais foram devidamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob número de protocolo 148/13 (Anexo).

Todos os procedimentos foram realizados com material cirúrgico estéril. Desta forma, foi realizada a dissecação e fragmentação do tecido, o qual foi lavado com tampão fosfato sem cálcio e magnésio estéril (PBS, 0,1 M, pH 7,4, Nutricell, Campinas, BR) e tripsinizado durante 10min a 37°C. Findo o tempo de tripsinização, foi adicionada DNAase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e, após homogeneização, SFB para bloqueio da ação enzimática. A solução sobrenadante foi colocada sobre um coxim de albumina bovina 4% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) em meio de cultura e submetida à centrifugação (250 xg por 10min). Ao precipitado foi adicionado meio DMEM e esta solução foi adicionada em garrafas de 25cm² (Nest Biotechnology CO., Shanghai, China) e estocadas em incubadora (incubadora Nuare, Plymouth, MN, USA) sob temperatura de 37°C e 5% de CO₂ até atingir a confluência de 80%. Após a confluência celular nas garrafas de cultivo, as células foram descoladas com tripsina e passaram novamente por centrifugação (250 xg por 10min) e, dessa vez, da solução celular foi retirada uma alíquota para quantificação das células e a quantidade de 5x10³ célula foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços (Nest Biotechnology CO., Shanghai, China), mantidas em incubadora por 3 dias a 37°C (cerca de 80% de confluência) para posterior infecção com SLEV.

4.4 *Teste de citotoxicidade de astrócitos ao SLEV (CC₅₀%)*

Neste trabalho, foi utilizado o ensaio colorimétrico com sal de MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991).

Um teste piloto foi realizado em ambas as culturas com períodos de 24h, 48h, 72h e 144h, para se determinar o tempo ideal de sua manutenção levando em consideração o aparecimento de efeito citopático. Nas culturas de VERO, foram observados efeitos citopáticos após 3 dias de incubação e, em astrócitos, após 6 dias de incubação. Foi considerado efeito citopático (CPE) alterações observadas nas culturas de acordo com a definição de Norkin (2010). Dentre as alterações causadas pela infecção por vírus com características semelhantes ao SLEV pode-se citar alterações na forma da célula, desorganização celular, indução de apoptose e consequente observação de que células em monocamada, aderidas ao vidro ou plástico, passam a ser observadas em suspensão.

Células VERO, sabidamente susceptíveis à infecção por SLEV, foram cultivadas em placa de 96 poços (5x10³ células/poço, 100 µL/poço) por 6 dias usando meio DMEM suplementado com 10% de SFB, em estufa de 37°C, 5% CO₂ e umidade controlada. As placas foram divididas em colunas de poços, distribuídas em coluna controle, VERO não infectadas

e VERO infectadas por SLEV nas concentrações de 1E-01, 1E-02, 1E-03, 1E-04, 1E-05, 1E-06 e 1E-07. Astrócitos, da mesma maneira, foram cultivados em placas de 96 poços e mantidas dentro dos mesmos parâmetros que as culturas de VERO. As colunas de poços foram distribuídas em coluna controle, sem células, astrócitos não infectados e astrócitos infectados por SLEV nas concentrações de 1E+01, 7,5E-01, 5E-01, 2,5E-01, 1E-01, 1E-02, 1E-03, 1E-04, 1E-05 e 1E-06.

O tempo de incubação com vírus foi de 1h, com agitação manual a cada 15 minutos, para todas as condições e, após esse período, as culturas foram mantidas por 6 dias (144h) em incubadora com alta umidade e atmosfera de CO₂ de 5% (Nuare, Plymough, MN, USA). Após incubação, todo o meio foi aspirado sendo adicionados 50µL de uma solução de MTT em todas as cavidades. A solução de MTT foi preparada em meio DMEM a 1mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4h nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirada a solução de cada cavidade e foram adicionados 100µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazana. As placas foram agitadas levemente à temperatura ambiente, por 10min, para que todos os cristais fossem solubilizados. A leitura das placas foi realizada a 540nm (Elx 800, Bio-Tek, Winnosky, VT, USA).

Foi calculado o percentual de citotoxicidade (taxa de mortalidade) que é o valor que faz referência à quantidade de células não viáveis presentes nas culturas infectadas em relação às células não viáveis nas culturas não infectadas. Essa taxa foi calculada da seguinte maneira:

$$[(A-B)/A \times 100]$$

Em que A é a absorbância das culturas infetadas e B a absorbância da cultura não infectada. Adicionalmente, para cada material-teste, foi calculado o valor de CC₅₀, que foi definido como a concentração de vírus que reduz a absorbância em 50%, quando comparada com a absorbância dos controles.

4.5 *Extração de RNA viral*

Culturas celulares de VERO e astrócitos foram infectadas com SLEV não diluído por 1h com agitação manual a cada 15 minutos. Em seguida, o meio de cultura contendo vírus foi removido e adicionado novo meio de cultura. As células permaneceram incubadas a 37°C por 6 dias. Após esse período, uma contendo VERO e outra com astrócitos, foram utilizadas para extração de RNA viral. A presença do genoma de SLEV em astrócitos e cultura VERO foi

testada por RT-PCR. Para fins de comparação, uma garrafa de cultura com VERO infectada foi congelada a -70°C e imediatamente descongelada para que houvesse lise celular com liberação viral.

Brevemente, a extração do RNA viral foi realizada a partir 140 μL de amostra obtida de cada uma das garrafas utilizando TRIZOL® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Do sobrenadante das amostras, 125 μL foram transferidos para um microtubo de 1,5mL, livre de DNases e RNases e foram adicionados 375 μL do TRIZOL®. Foram adicionados 200 μL de clorofórmio para separação das fases orgânica (com DNA) e aquosa (com RNA). A amostra foi agitada e incubada de 2 a 3min à temperatura ambiente. O tubo foi em seguida centrifugado a 12.000xg por 15min a 4°C (5810R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Com isso, ocorreu a separação em duas fases, sendo a fase aquosa (superior) transferida cuidadosamente para outro tubo onde foram adicionados 2,5 μL de glicogênio (20mg/ml) e 300 μL de isopropanol para precipitação do RNA. A solução foi agitada 15 vezes por inversão, seguindo-se uma incubação de 10min à temperatura ambiente. Procedeu-se nova centrifugação a 12.000xg por 10min a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 500 μL de etanol (75% em água DEPC). O tubo foi agitado por inversão e submetido à centrifugação a 7.500xg a 4°C por 5min. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e aguardou-se 10min para a secagem do sedimento. Finalmente, o RNA foi dissolvido em 20 μL de água tratada com DEPC e armazenado à -70°C (Nuare, Plymouth, MN, USA), até o momento do uso.

4.6 Transcrição reversa (RT) para obtenção de cDNA

A reação de transcrição reversa foi realizada segundo descrito por Bronzoni *et al.* (2005) com *primers* para o gene NS5 do *Flavivirus* (232 pares de bases). Foi realizada em 1,5 μg de RNA, com 100U de transcriptase reversa MMLV (USB, USA), 40U do inibidor de RNase *RNAaseOut* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), 15mM do *primer* reverso FG2 (GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA) (Fermentas International Inc., Burlington, New England Biolabs INC., Ipswich, MA, USA), 0,1mM de cada um dos quatro oligonucleotídeos (dNTP) e solução tampão contendo 250mM de Tris pH 8.3, 15mM de MgCl_2 , 375mM KCl e 50 μM de DTT. A mistura foi incubada a 42°C / 1h e 70°C / 5min, para obtenção do cDNA e armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.7 *Reação de PCR para detecção do SLEV*

A reação de amplificação foi realizada em duas etapas (1ª PCR e Nested PCR), com volume final de 20µL. Na primeira amplificação, a reação foi composta de 2µL do cDNA, 0,2µL (1U) de Taq polimerase (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), 0,4µL (10µM) de cada dNTPs, 1,3µL (15pmol/µl) de cada *primer forward* FG1 (sequência: TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT) e reverso FG2, 2µL da solução tampão 10x [600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180mM sulfato de amônia] e 12,8µL de água DEPC. As condições da reação de amplificação foram 94°C/ 2minutos, 30 ciclos de 94°C/ 1min, 60°C/ 1min e 72°C/ 2min, seguidos por uma extensão final de 72°C/ 2min. Em VERO as reações incluíram controles negativos (VERO não infectados e água) e duas amostras (VERO infectada com células lisadas por congelamento e VERO infectada não lisada). Em astrócitos as reações incluíram controles negativos (dois controles de astrócitos não incubados com vírus e água), um controle positivo (VERO infectadas) e três amostras (astrócitos incubados com SLEV). A Nested procedeu-se basicamente da mesma maneira. A reação foi composta de 1µL do produto da primeira PCR, 0,4µL (15pmol/µL) dos *primers* semi-nested FG1 e nSLEV (sequência: ATTCTTCTCTCAATCTCCGT), 2µL da solução tampão 10x [600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM sulfato de amônia], 0,2µL (5U/µL) de Taq polimerase (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), 0,4µL (10µM) de cada dNTPs e 15,6µL de água mili-Q estéril. As condições da reação de amplificação foram 94°C/ 1 minuto, 35 ciclos de 94°C/ 1min, 57°C/ 1min e 72°C/ 2min. As reações incluíram controles positivos, negativos e água conforme já descritos. Os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em solução tampão de TRIS-borato-EDTA (TBE) 0,5X, revelados com brometo de etídeo, visualizados com transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados. Foi utilizada para referência de tamanho molecular um LowRanger 100bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canadá). O tamanho da banda esperada foi de 232 pares de bases.

4.8 *Imunocitoquímica*

Para detecção de proteínas virais intracelulares nas culturas de astrócitos foram utilizados anticorpos policlonais obtidos de fluido ascítico imune de camundongos (MIAF) de SLEV e Oropouche vírus (OROV) produzidos no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e gentilmente doados para o presente trabalho pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

Astrócitos em placas de 96 poços foram infectados durante 1 hora com SLEV nas diluições de 1E+00, 5E-01, 1E-01, 1E-02, 1E-03, 1E-04, 1E-05 e 1E-06 e OROV na diluição de 1E-02 do título estocado (não titulado), exceto a primeira coluna (controle negativo de infecção). Após 6 dias de incubação o meio de cultura foi aspirado e as culturas fixadas com paraformaldeído 4% (Synth, Diadema, BR) em DMEM, lavadas com PBS (0,1M, pH 7,4, Nutricell, Campinas, Brasil) e, posteriormente, incubadas a 37°C por 1h com solução bloqueadora de ligações inespecíficas composta de BSA 3% e Triton-X100 0,2% (Synth, Diadema, BR). Em seguida, os astrócitos incubados com os anticorpos primários foram mantidos em câmara úmida a 4°C durante 24h. Os anticorpos primários utilizados encontram-se resumidos na tabela 1. Todos os testes imunocitoquímicos foram realizados em duplicata.

Tabela 1: Relação de anticorpos primários utilizados para avaliar as interações SLEV-astrócito por imunocitoquímica. Tipo de anticorpo, animal de onde foi obtido, objetivo, diluição utilizada e fornecedor.

ANTICORPO	ANIMAL ORIGEM	PROPÓSITO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
Anti-GFAP	Cabra	Avaliar grau de reatividade glial	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA.
Anti-caspase-3 clivada (p11)	Coelho	Avaliação de apoptose	1:200	Abcam, Cambridge, MA, USA.
Anti-MHC-I	Camundongo	Avaliação da resposta imunológica	1:100	Serotec
Anti-MIAF SLEV	Coelho	Identificação de proteína de SLEV	1:100	Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina da USPRP
Anti-MIAF OROV	Coelho	Identificação de proteína de SLEV	1:100	Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina da USPRP

Após a incubação primária, as culturas foram novamente lavadas com PBS e incubadas durante 1h com anticorpos secundários conjugados com Alexa-Fluor 488 ou 594 (anti-cabra, anti-camundongo ou anti-coelho; Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA). As culturas foram coradas com DAPI (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) para visualização dos núcleos celulares. Findo o tempo de incubação e lavagens, as culturas foram mantidas com glicerol/PBS/DAPI para análise em microscópio invertido de fluorescência.

Foram feitas quatro fotografias por poço abrangendo campos que representassem a condição observada em cada um dos poços. Análises qualitativas foram feitas para as culturas imunomarcadas com anti-SLEV, anti-OROV e anti-GFAP. E, análises quantitativas foram feitas para as imunomarcações com caspase-3 e MHC-I (Ox). A primeira consistindo de contagem das células caspase-3 positivas e análise estatística com teste U de Mann Whitney. A segunda, imunomarcção anti-MHC-I, através da análise por densitometria de pixel das fotomicrografias com aplicação do teste estatístico ANOVA um critério e pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram apresentados como média \pm ep e para as comparações entre grupos assumiu-se nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Através do ensaio de PFU foi obtido um título de $7,7E+08$ PFU/ml da solução viral que compunha o estoque de SLEV usado no trabalho. Uma alíquota deste mesmo estoque também foi submetida à titulação por MTT obtendo-se um título de $1,58E+09$ TCID₅₀/ml. Com a aplicação da fórmula de equiparação dos títulos por PFU e MTT, baseada na distribuição estatística de Poisson, descrita na metodologia, o resultado corrigido do PFU foi de $1,09E+09$, bem mais próximo do título obtido por MTT. A título de ilustração, a Figura 1 mostra a vista de uma placa de PFU após a coloração com cristal violeta para evidenciar a formação de placas de lise. Estas placas após contadas permitem o cálculo do título viral.

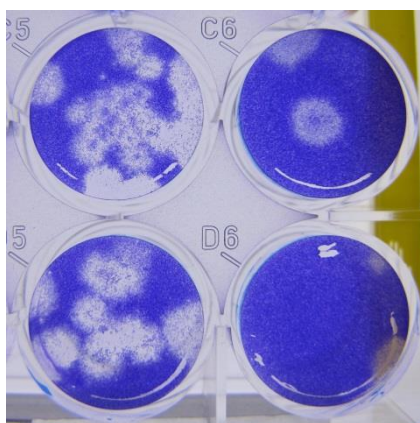


Figura 1: Exemplo de formação de placas em um ensaio de PFU após incubação viral em diluições seriadas e decrescentes dos poços C5, D5, C6 e D6.

A medida da absorbância do ensaio de MTT em células VERO revelou que o valor de CC₅₀, ou seja, a concentração viral que causa redução de 50% da absorbância das células em cultura, quando comparada à leitura das células não infectadas foi de $9E-04$. A Figura 2 mostra o gráfico das medidas de absorbâncias em VERO com comprimento de onda de 540nm. Como se pode observar, a medida de CC₅₀ (0,55), representado pelo traço vermelho, corresponde a uma concentração viral que fica entre as concentrações de $1E-03$ e $1E-04$. Desta forma observa-se que as concentrações de $1E-01$ e $1E-02$ causam morte de mais de 50% das células em cultura. Já para astrócitos (Figura 3) este valor seria de $9E-01$, ou seja, quase o equivalente a se utilizar vírus não diluído nas culturas celulares na concentração do estoque viral produzido ($1,09E+09$ PFU/ml). Estes resultados sugerem que os astrócitos possam ser células resistentes à infecção por esta cepa de SLEV.

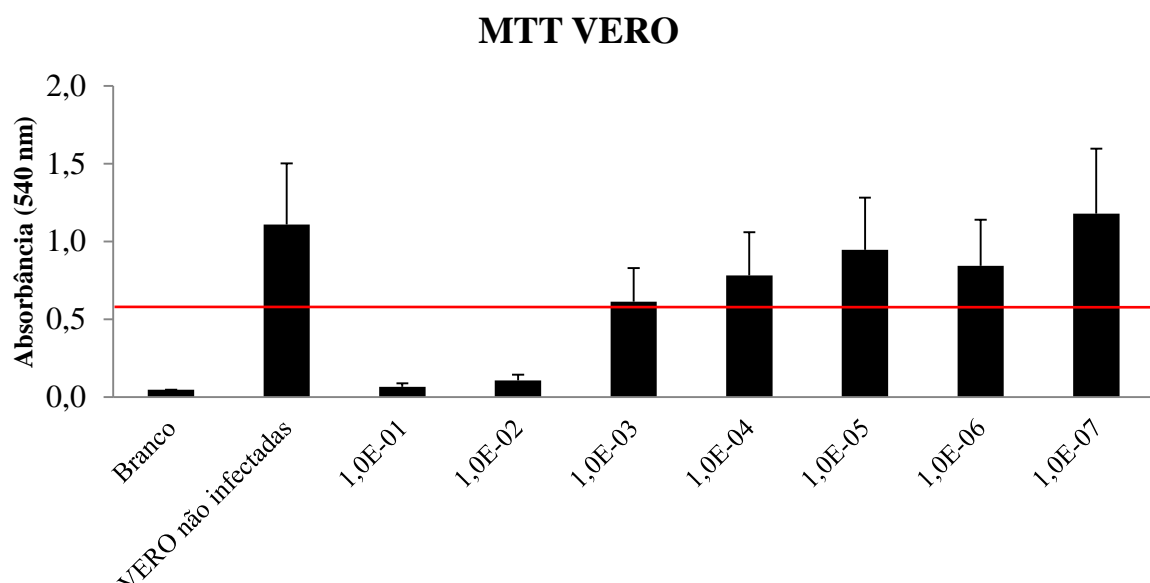


Figura 2: Gráfico mostrando a leitura de absorbâncias (eixo y) de MTT em células VERO em diferentes concentrações virais (eixo x). A linha vermelha representa a medida de CC50 (0,55) demonstrando que a diluição viral que causaria morte de 50% das células em cultura seria de aproximadamente 9E-04, ou seja, uma diluição entre 1E-03 e 1E-04.

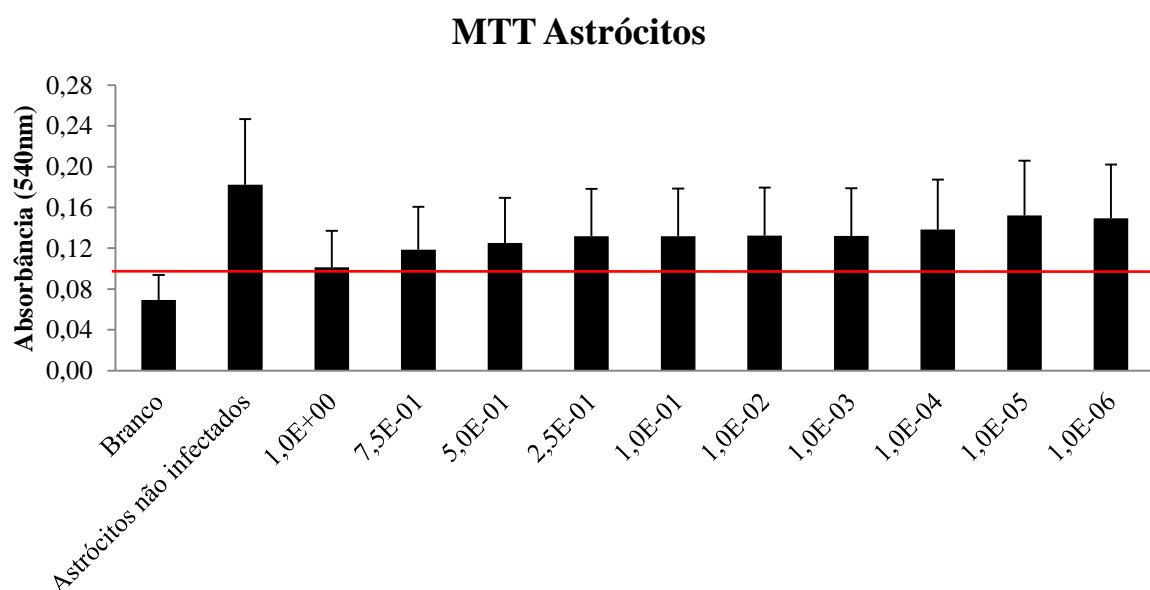


Figura 3: Gráfico mostrando a leitura de absorbâncias (eixo y) de MTT em astrócitos em diferentes concentrações virais (eixo x). A linha vermelha representa a medida de CC50 (0,09) demonstrando que a diluição viral que causaria morte de 50% das células em cultura seria de aproximadamente 9E-01, ou seja, uma diluição entre 7,5E-01 e 1E+00, que representa uma alíquota de vírus não diluído na concentração de 1,09E+09.

Para compreender se esta possível resistência dos astrócitos frente à infecção por SLEV se deu pela resistência à invasão viral ou se ela seria decorrente da capacidade da célula de conviver com o parasita intracelular sem que houvesse morte celular, calculamos a taxa de mortalidade celular de cada cultura conforme descrito no item material e métodos

desse trabalho. O percentual de citotoxicidade indica a taxa de mortalidade de cada grupo de diluição viral comparado ao grupo controle. Em células VERO (Figura 4), na concentração de 1E-01, foi observada taxa de mortalidade celular 1575,85% maior que a mortalidade do grupo controle não infectado. Conforme a concentração viral na solução infectante diminuía, a taxa de mortalidade celular de VERO foi reduzida proporcionalmente, de forma que na menor concentração testada (1E-07) foi observado crescimento das células em cultura apesar da presença do patógeno (-5,92%). Em astrócitos (Figura 5), a taxa de mortalidade da cultura infectada pelo vírus não diluído foi de 79,85% das células. De maneira semelhante a VERO, observou-se uma redução gradual da taxa de mortalidade celular conforme a concentração viral nas culturas era reduzida. Na última concentração testada (1E-06) a taxa de mortalidade obtida foi de 21,99%.

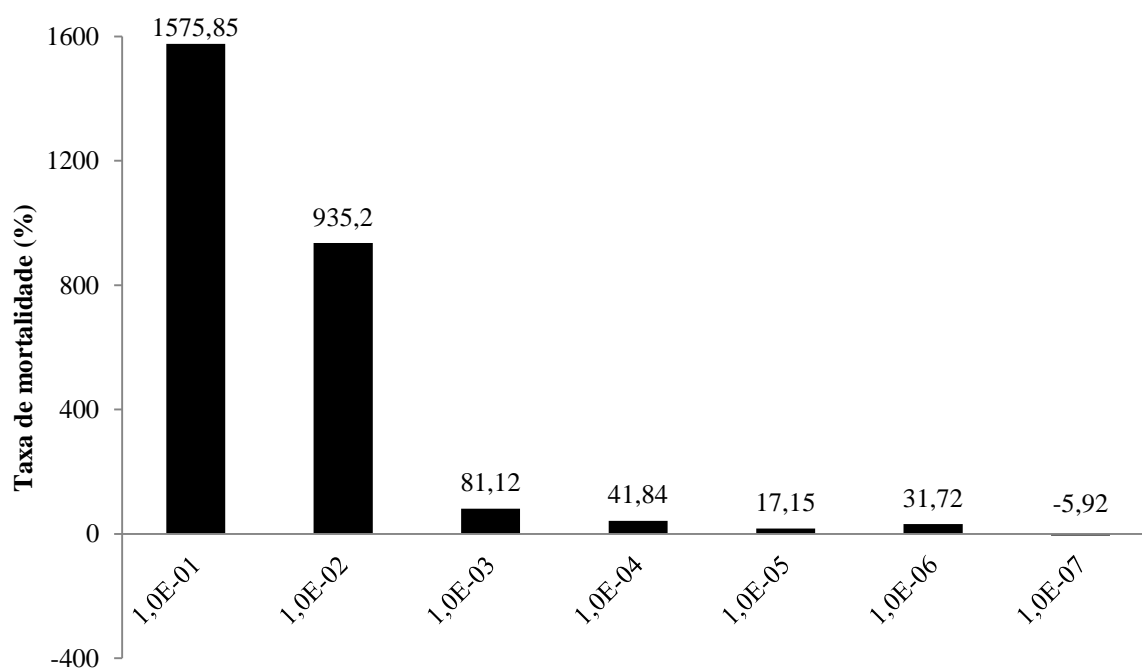


Figura 4: Taxa de mortalidade de células VERO frente à infecção por SLEV em diferentes concentrações comparada às células VERO não infectadas. Note que o CC_{50} está entre as concentrações 1,0E-03 e 1,0E-04.

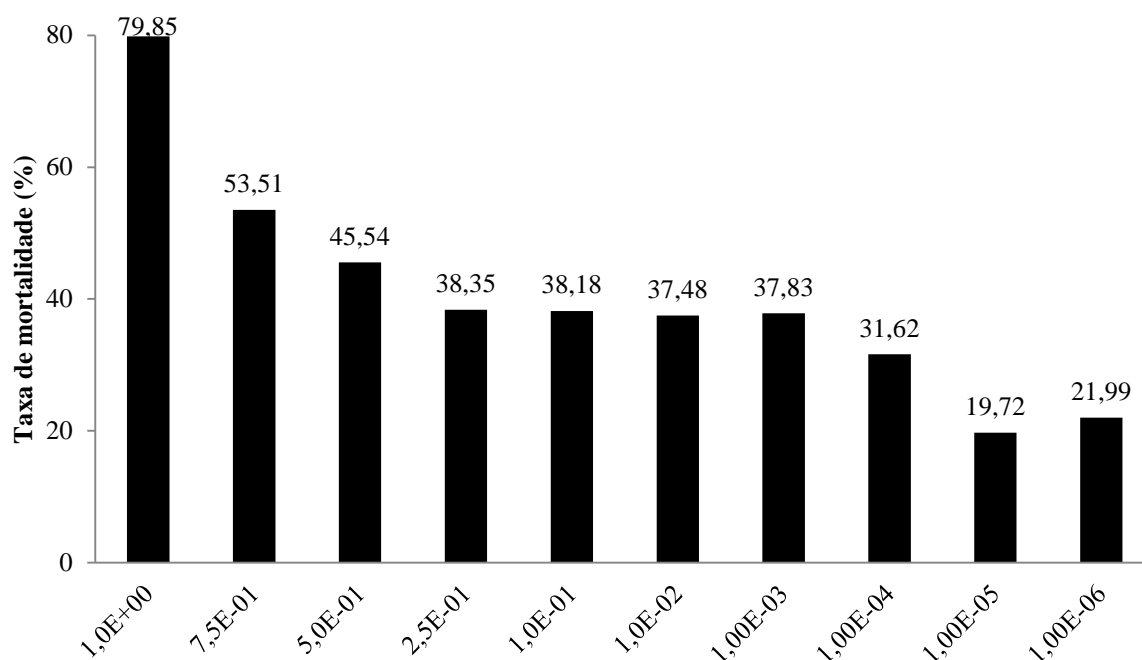


Figura 5: Taxa de mortalidade de astrócitos frente à infecção por SLEV em diferentes concentrações comparado aos astrócitos não infectados. Note que o CC_{50} está entre as concentrações 7,5E-01 e 5,0E-01.

Conhecido o título das amostras e que a exposição ao SLEV aumentava a taxa de mortalidade de ambos os tipos celulares procedeu-se o ensaio de RT-PCR das células em cultura para confirmar a presença de genoma de SLEV nas amostras de VERO e astrócitos. A imagem 6A mostra a reação de RT-PCR de células VERO a partir de amostras não infectadas, de sobrenadante com e sem células lisadas. A primeira e última colunas do gel de agarose representam o controle negativo de infecção viral de VERO e controle negativo da reação respectivamente. A coluna do meio representa o *ladder* e nas colunas 2 e 4 as amostras constituídas por VERO lisadas por congelamento e não lisadas, respectivamente, encontram-se *amplicons* na altura de 232 pares de bases.

A Figura 6B mostra o gel de agarose testado para presença de SLEV em culturas de astrócitos. A coluna 1 e 2 representam os controles negativos das culturas celulares, a coluna 7 e 8 representam o *ladder* e o controle negativo da reação (água). Na coluna 3 uma amostra de SLEV diretamente do estoque viral obtido através das células C6/36, utilizado como controle positivo do vírus. As colunas 4, 5 e 6 representam amostras de cultura de astrócitos expostas ao SLEV. Como pode ser observado, nas três amostras, *amplicons* na altura de 232 pb apresentaram-se indicando a presença de genoma viral nas culturas celulares.

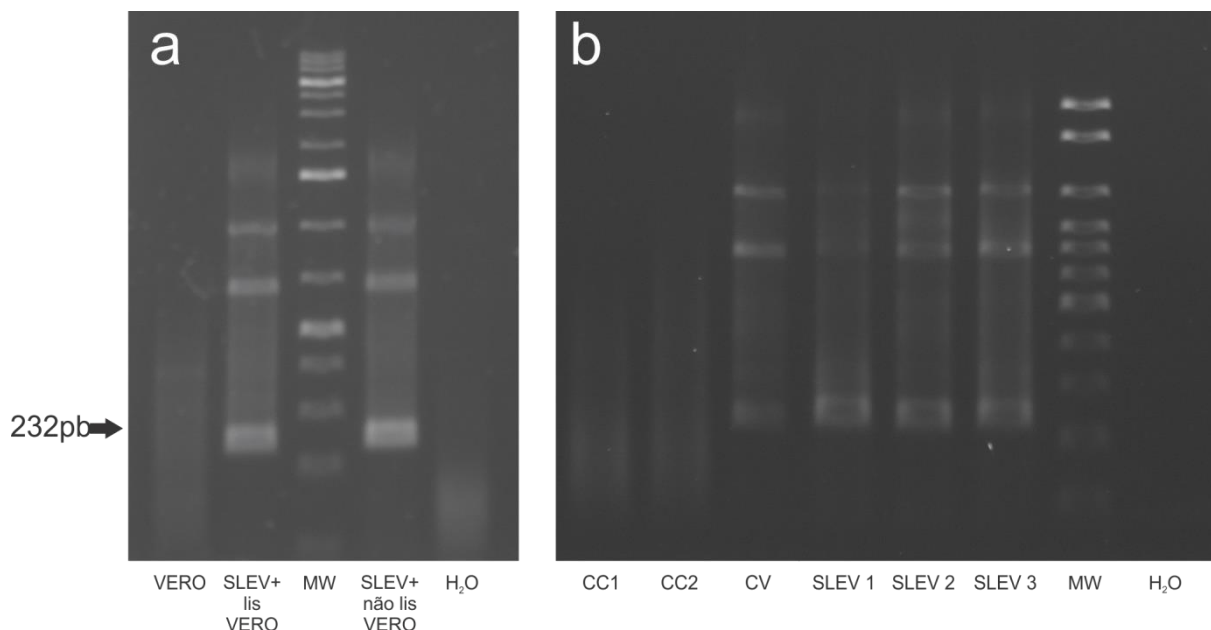


Figura 6: Fragmento genômico amplificado de vírus da encefalite de Saint Louis (232pb) em amostra de linhagem celular VERO (A) e astrócitos (B). (A) VERO: controle negativo; SLEV+lis VERO: sobrenadante de células VERO infectadas e lisadas por congelamento; MW: ladder; SLEV+não lis VERO: sobrenadante de células VERO infectadas não lisadas por congelamento; H₂O: controle negativo da reação; (B) CC1 e CC2: controles negativos de astrócitos; CV: controle positivo de SLEV; SLEV 1 a 3: sobrenadante de astrócitos infectados não lisados por congelamento; MW: ladder; H₂O: controle negativo da reação.

Embora tenha sido demonstrada a presença de genoma de SLEV na cultura de astrócitos, não se pode afirmar se, de fato, ocorre infecção ou replicação viral no interior da célula, uma vez que vírus poderiam, por exemplo, estar apenas adsorvidos na membrana plasmática dos astrócitos sem conseguirem penetrar estas células.

Para se confirmar se de fato vírus poderiam ser encontrados no interior celular, utilizou-se anticorpo anti-SLEV sobre as culturas. Amostras de OROV (Oropouche Vírus) foram utilizadas para infectar astrócitos em outras culturas e funcionarem como controles negativos da especificidade do MIAF anti-SLEV. Da mesma forma, anticorpo anti-OROV também foram usados para marcar as culturas com esse vírus.

A imunomarcação anti-SLEV, mostrada na Figura 7, revela que uma grande quantidade de vírus se encontra no interior dos astrócitos quando estas células são expostas à solução não diluída de vírus (marcação vermelha). De forma interessante, observa-se que esta marcação foi mais evidente em regiões perinucleares, conhecidas por predominar retículo endoplasmático rugoso (RER), uma organela essencial à replicação viral, e regiões nucleares de células em apoptose, que apresentam núcleo com aspecto vacuolizado e cromatina dispersa no citoplasma da célula. Todo material genético celular encontra-se corado em azul pela coloração com DAPI, que cora ácidos nucleicos. As cabeças de setas brancas no MIAF de

SLEV não diluído ilustram a questão da destruição nuclear durante a morte celular que, com a ruptura do envoltório nuclear, tem seu conteúdo de ácidos nucléicos espalhado pelo citoplasma. O núcleo recém-destruído, por sua vez, assume um aspecto escurecido, quase totalmente sem DAPI, dito como vacuolizado. Os anticorpos anti-SLEV, por sua vez, são observados formando grande grumos em região perinuclear ou, algumas vezes, como pequenas vesículas vermelhas na periferia ou mesmo fora das células. Este aspecto está diretamente relacionado ao ciclo de replicação dos *Flavivirus* que ocorre no RER e termina com o brotamento de vesículas oriundas do complexo de Golgi na membrana plasmática. Conforme a diluição viral aumenta o número de astrócitos imunomarcados com anticorpo anti-SLEV diminui significativamente. Na diluição 1E-06 observa-se uma pequena diminuição na população de astrócitos comparada ao controle, porém, quase não se observa imunomarcagem para o vírus. Nos astrócitos infectados com OROV é observado um grande número de células em apoptose e, como esperado, sem imunomarcagem anti-SLEV.

Já na imunomarcagem com anticorpo anti-OROV (Figura 7) não é observada marcação nas células infectadas com SLEV mostrando a especificidade do anticorpo. Por sua vez, os astrócitos infectados por OROV na diluição de 1E-02 apresentam intensa marcação com alterações morfológicas semelhantes às descritas para infecção por SLEV não diluído com grandes grumos de anticorpos perinucleares e pequenas vesículas fortemente marcadas na periferia e exterior celular.

Como dito anteriormente os astrócitos são células apresentadoras de antígenos, que controlam a permeabilidade da BBB, homeostase do CNS e mobilizam células de defesa da corrente circulatória para o sistema nervoso central. Estas ações se dão por meio de um fenômeno de modificações estruturais celulares denominado astrogliose que, como também já dito, se manifesta através de aumento na expressão de proteína fibrilar ácida da glia (GFAP), aumento no número e comprimento dos prolongamentos citoplasmáticos astrocitários, dentre outros. Para observar se a infecção por SLEV e OROV desencadeiam astrogliose as células em cultura foram marcadas com anti-GFAP.

Quando os astrócitos são expostos ao SLEV não diluído é observado que a maioria das células encontram-se em processo apoptótico, com redução no tamanho e/ou desorganização do núcleo celular, diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos, que se mostram espessos e curtos. As setas brancas nesta fotomicrografia (GFAP de SLEV não diluído) apontam núcleos em processo apoptótico. As concentrações de SLEV a 5E-01, 1E-01 e 1E-06 mostram intensa astrogliose marcada por um aumento no número e comprimento de prolongamentos

citoplasmáticos, aparentemente proporcional à concentração viral contaminante e aumento na expressão de GFAP. As culturas de astrócitos infectados por OROV e marcadas por GFAP se mostram com grande número de células mortas ou em apoptose (setas brancas). O citoplasma das células que permanecem vivas se mostra com aspecto estrelado, com prolongamentos em número pequeno, espessos e mais fracamente marcados para GFAP.

A marcação para caspase-3 clivada mostra o número de astrócitos em apoptose desencadeada pela infecção pelos vírus. Quando comparadas ao controle celular, todas as culturas infectadas por SLEV e OROV apresentam-se com maior número de células caspase-3 positivas e este aumento é proporcional à maior concentração de vírus na diluição. A fotomicrografia de CASP-3 em SLEV não diluído e em OROV 1E-02 mostram intensa marcação e grande número de células com núcleo vacuolizado pela destruição da membrana nuclear. Diferente da fotomicrografia do controle celular, pode-se observar que nessas imagens o material genético, que deveria estar contido no núcleo, encontra-se espalhado por todo citoplasma celular. Foi realizada análise quantitativa do número de células em apoptose (expressando caspase-3 clivada).

Como observado na Figura 8, a infecção de astrócitos por SLEV sem diluição induziu morte celular por apoptose em 85,37% das células em cultura, valor este ainda menor que das células infectadas com OROV diluído a 1E-02, cuja taxa de expressão de caspase-3 chega a 85,99%. Já nas maiores diluições de SLEV observa-se que o número de células caspase-3 positivas são inferiores, em torno de apenas 12%, não havendo variação significativa entre os grupos de 5E-01, 1E-01 e 1E-06. Estes dados em conjunto sugerem que, ou existe resistência à infecção de SLEV por astrócitos ou que o astrócito é uma célula bem adaptada a esta cepa de SLEV, de forma que, em concentrações mais baixas, o astrócito é capaz de coexistir com o parasita intracelular.

Diversos vírus como o Epstein-Barr (ZUO et al., 2011) e Herpes Simplex Vírus 1 (IMAI et al., 2013) possuem em seu genoma regiões codificantes de quinases, geralmente utilizadas para driblar o sistema imunológico durante a infecção. Em contraste aos vírus que evitam a resposta imune do hospedeiro pela regulação por inibição de MHC na superfície celular, os *Flavivirus* induzem a expressão de moléculas de MHC-I, II e diversas moléculas de adesão, se utilizando deste sistema de sinalização, que leva à lise celular por linfócitos T citotóxicos, para aumentar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção viral. Embora não tenha sido encontrado na literatura informações sobre a adaptação de células de vertebrados à infecção por SLEV em cultura, essa possibilidade deveria ser levada em consideração, pois

uma adaptação de astrócitos em cultura ao vírus poderia comprometer a interpretação dos resultados obtidos ou poderiam sugerir, como afirmou Diniz et al. (2006), que os astrócitos poderiam estar relacionados à infecções crônicas também por SLEV. Como mencionado, anteriormente os astrócitos expressam MHC, teoricamente, caso houvesse adaptação à cepa viral de forma a permitir a coexistência entre astrócitos e vírus de forma crônica, uma das vias que poderiam sofrer *downregulation* seria o complexo de histocompatibilidade principal. Para testar se os astrócitos em cultura apresentavam adaptação ao vírus permitindo esta “coexistência” com SLEV estas células foram testadas para ativação do sistema imunológico via MHC-I. Embora astrócitos *in vitro* apresentem por si só um aumento na expressão de MHC-I, após a infecção por SLEV e OROV as células em cultura apresentaram intensa modificação no padrão de expressão de MHC-I, proporcional ao aumento da concentração viral na amostra, sendo os maiores aumento de expressão de MHC-I observados no SLEV não diluído, sugerindo que, caso exista adaptação do astrócitos ao vírus, esse não perde sua capacidade de apresentação deste antígeno. As culturas de células imunomarcadas para MHC-I foram fotografadas e submetidas a quantificação da densidade integrada de pixels, com auxílio do Software ImageJ 1.33u (UTHSCA, CA, USA) (Figura 9). Foi observado um aumento significativo de 43,9% e 31,12% da expressão de MHC-I em astrócitos infectados por SLEV na concentração não diluída e a 5E-01, respectivamente. A exposição de astrócitos ao OROV na concentração de 1E-02 também resultou em astrogliose com aumento de 49,73% na expressão de MHC I. Esses achados mostram os receptores de MHC-I de astrócitos são capazes de reconhecer peptídeos virais de SLEV e OROV que, ao ser ativados, disparam a via de sinalização imunológicas que culmina na ativação de células CD8+ para o CNS.

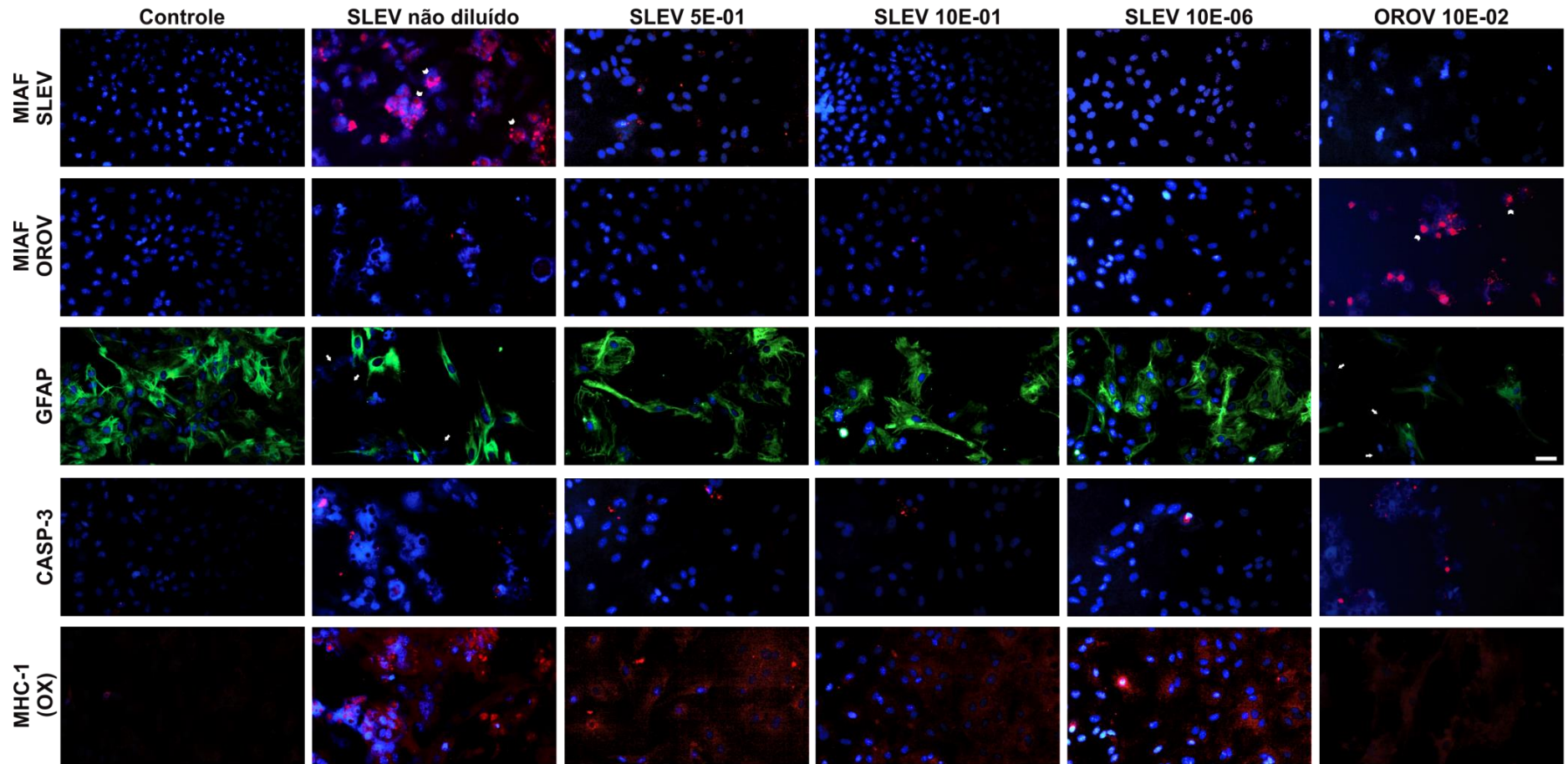


Figura 7: Imunofluorescência em culturas de astrócitos após 6 dias de infecção por SLEV e OROV. Coloração com DAPI e anticorpos específicos. As cabeças de setas brancas no MIAF de SLEV e de OROV não diluído demonstram a localização perinuclear das partículas virais e a destruição nuclear durante o processo de morte celular que, com a ruptura do envoltório nuclear, tem seu conteúdo de ácidos nucleicos espalhado pelo citoplasma. As setas brancas na marcação com GFAP de SLEV não diluído apontam para núcleos em processo apoptótico. Escala = 50µM.

Caspase 3 em astrócitos

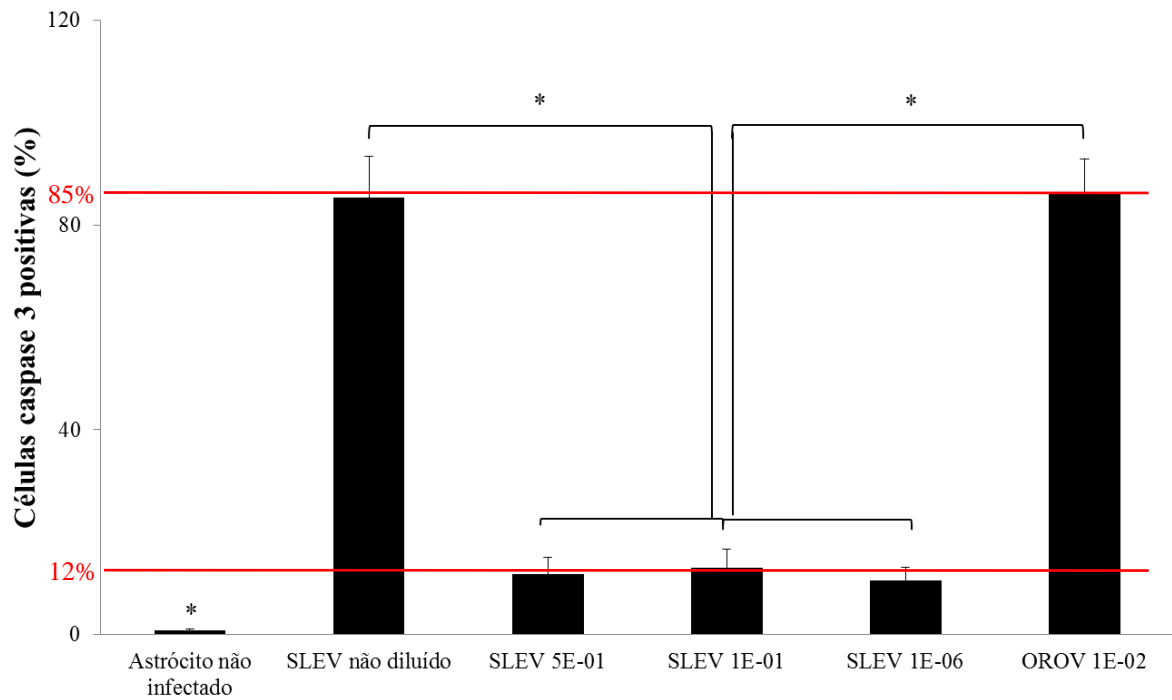


Figura 8: Imunomarcção anti-caspase-3 clivada em astrócitos não infectados e infectados por diluições seriadas de SLEV e OROV 1%. Teste U de Mann Whitney, $p < 0,05$ (*).

Expressão de MHC-I

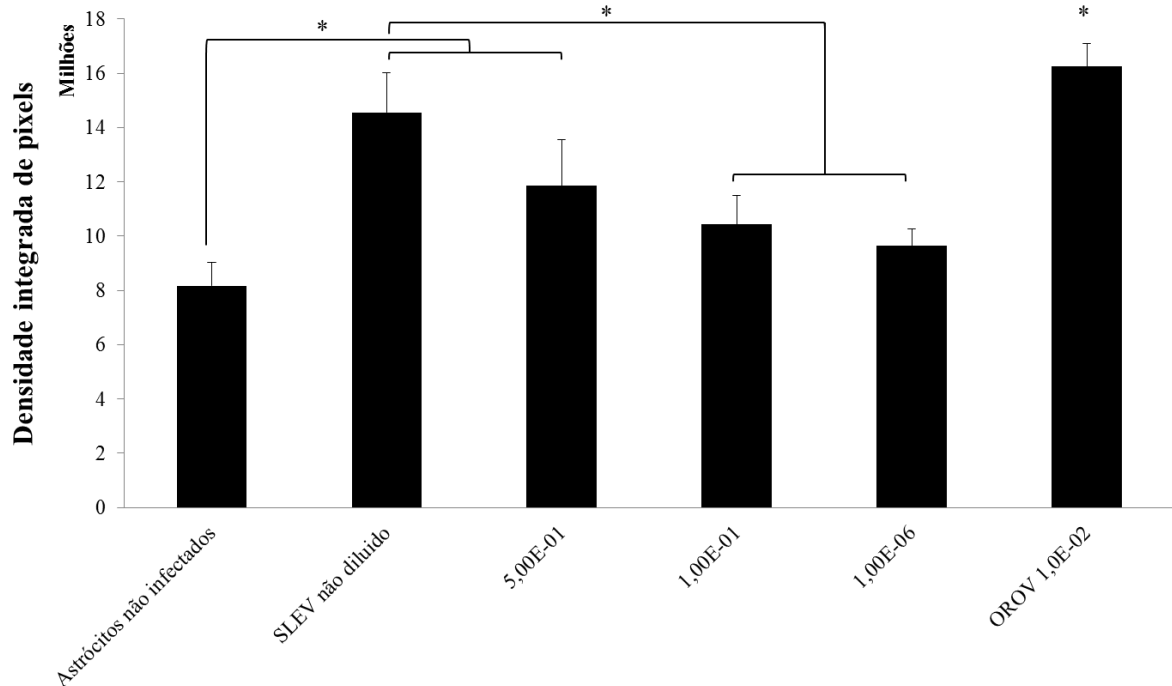


Figura 9: Análise por densitometria de pixel da expressão de MHC-I em astrócitos não infectados por SLEV e infectados em diluições variadas. Teste ANOVA 1 critério e pós-teste de Bonferroni. (*) $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Como já mencionado a SLE apresenta baixa incidência em humanos. E mesmo quando presente, seu diagnóstico é dificultado, visto que pode se assemelhar a episódios isquêmicos transitórios, insolação, intoxicação por drogas, encefalopatia metabólica, distúrbios hidroeletrolíticos, além de suas características clínicas poderem se sobrepor à de outras doenças como infecções por WNV, enterovirose, EEE, EEO, HSV, doença da arranhadura do gato, meningites por micoplasma, bactérias ou fungos, meningites bacterianas parcialmente tratadas, leptospirose e encefalite por *Listeria* (MONATH, 2012). Além disso, ainda não existe relato de medicamento antirral eficaz no tratamento da SLE, nem vacina que previna seu surgimento. Por isso, é importante conhecer-se mais sobre esta doença e acerca de como o vírus interage com células da barreira hematoencefálica se instalando no CNS, pois este fenômeno é crucial na etiopatogenia da encefalite pelo vírus de Saint Louis.

A cepa BeH355964 foi isolada de um paciente infectado pelo vírus em 1978 em Belém, PA, Brasil (PINHEIRO et al., 1981; apud RODRIGUES et al., 2010). Rodrigues et al. (2010), em uma análise filogenética baseada no gene E do SLEV, encontraram que este vírus se encontra amplamente distribuído nas américas, com 30 cepas no Brasil, inclusive demonstraram a presença de uma nova linhagem viral (VIII) na Amazônia brasileira. Segundo eles, a cepa pesquisada no presente trabalho pertenceria a linhagem Vb. Embora não tenham sido encontrados relatos sobre a neurovirulência desta cepa, Brinton e Dispoto (1988) relataram que a região não codificante do término-5' era uma região extremamente conservada entre cepas de SLEV. E que três outras cepas de SLEV, de baixa virulência, apresentavam uma única substituição de base na posição 16, porém a cepa BeH355964 não foi estudada por eles, de forma que nada se pode afirmar sobre a virulência dela. De acordo com estes autores a estrutura secundária do RNA viral (vRNA) é funcionalmente importante na determinação da virulência de uma cepa viral, pois pode influenciar na acessibilidade ao códon de iniciação pelas proteínas envolvidas na tradução do vRNA. Por exemplo, fenômenos de translocação gênica, adição ou deleção de bases no RNA viral podem resultar em modificações na estrutura secundária desta molécula. Quando o acesso ao códon de iniciação pelas proteínas da tradução se encontra dificultado, essa molécula pode não ser traduzida com tanta eficiência quanto ocorre com cepas virulentas, que apresentam fácil acesso ao códon de iniciação, resultando em produção de menos partículas virais e menores títulos ou, em casos de mutações extremas, a molécula de RNA viral pode sequer ser traduzida.

Ainda sobre os determinantes genéticos para a virulência do patógeno, Maharaj et al., (2011) utilizaram viroses quiméricas de SLEV e WNV para fazer infecção *in vitro* de células

de vertebrados (VERO e pato) e de invertebrado (*Culex*) observando que, em ambas as linhagens de vertebrados, os títulos de WNV foram cerca de 100 vezes maior do que de SLEV e que, os fenótipos quiméricos exibiam alteração de crescimento e citopatogenicidade. Já Ciota et al. (2014), avaliaram o potencial de adaptação de SLEV para um possível novo hospedeiro (carrapato) e observaram que com uma mínima mudança na sequência genética consensual do vírus ele passava a ser capaz de infectar o carrapato. No entanto, ao longo das várias passagens por células de carrapatos, os vírus perderam sua capacidade de infectar células de vertebrados. Esses achados nos levaram a questionar se a resistência encontrada na infecção de astrócitos não poderia ser decorrente de alterações gênicas acumuladas ao longo das passagens dos vírus em culturas celulares para produção de novos estoques virais. Justamente para descartar a possibilidade de que poderia ter ocorrido adaptação do SLEV aos astrócitos, levando a uma falsa resistência da célula ao vírus, optou-se neste trabalho por produzir o estoque viral em linhagem de invertebrado, C6/36 de *Aedes albopictus*, a qual o vírus encontra-se bem adaptado atingindo maiores títulos quando cultivados, e testá-los de forma comparativa em duas linhagens de vertebrados mamíferos, a de células VERO e a cultura primária de astrócitos de camundongos Swiss.

Os métodos de PFU, MTT e outros, que avaliam a morte celular, citotoxicidade, dentre outras características, possuem importante valor diagnóstico em pesquisa com vírus permitindo a estimativa do número de partículas virais viáveis em uma determinada amostra. Embora seja possível estimar o número de vírus viáveis em amostras, sabe-se que estes valores são aproximados, não representando muitas vezes um número exato. Isto se torna evidente ao se observar a diferença entre os títulos obtidos por PFU ($7,7E+08$ PFU/ml) e MTT ($1,58E+09$ TCID₅₀/ ml) neste trabalho, não sendo possível afirmar qual dos títulos seria o mais próximo do número real de partículas virais nas amostras que compunham o estoque viral empregado. A dificuldade de comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de titulação se dá pela própria metodologia empregada em cada teste.

No ensaio de formação de placas, teoricamente, cada partícula infectante, ao penetrar uma célula em cultura, originaria uma placa de lise pela ruptura da membrana plasmática da célula infectada, e o número de placas de lise, ao serem contados resultariam no título viral da amostra. Na prática, o que muitas vezes pode ocorrer, é que não apenas um, mas centenas de vírus poderiam infectar uma única célula em cultura, originando uma única placa de lise. Além disso, é possível que um vírus ativo ao ser colocado em meio de cultura não consiga infectar nenhuma célula, o que também depende de fatores como a própria confluência das

células em cultura. Dessa forma, na prática, o método de PFU poderia não traduzir a quantidade de vírus numa amostra.

Obviamente ainda existem diversos fatores intrínsecos e extrínsecos ao processo de titulação que podem causar interferência alterando os valores do título viral. É sabido que fatores como temperatura de acondicionamento e manipulação das amostras, ou mesmo a própria calibração e o fator humano, que estão diretamente ligados à experiência de quem executa o experimento, poderiam resultar em diferentes concentrações virais em alíquotas de uma mesma amostra.

O ensaio de MTT, por sua vez, avalia a função das desidrogenases mitocondriais, que reduzem o sal de MTT em formazana no interior das células (SIEUWERTS et al, 1995). O teste parte do princípio que a infecção viral causaria morte celular e, desta forma, as células mortas são incapazes de converter o MTT em formazana. Porém, este teste não é capaz de discriminar células que estão em processo de apoptose por outras causas que não a infecção viral, ou mesmo as que já reduziram parcialmente seu metabolismo por outros fatores como senescência ou fase do ciclo celular, por exemplo, reduzindo assim, sua capacidade mitocondrial e/ou número de mitocôndrias citoplasmáticas, que pode variar entre diferentes linhagens de células como VERO e astrócitos. Além disso, caso exista uma certa adaptação da célula em cultura ao patógeno, no caso o SLEV ou OROV, também há possibilidade do vírus coexistir no interior celular se replicando sem induzir a morte celular ou alterações no metabolismo mitocondrial, o que resultaria em valores de leitura do teste discrepantes.

Contudo, havia necessidade de estabelecer uma correlação entre os dois métodos de titulação para assegurar um valor mais exato de partículas virais infectantes numa determinada amostra. E, uma vez que o processo de inoculação viral em uma cultura de células é semelhante a uma distribuição randômica de partículas sobre uma superfície, Graentzdoerffer e Nemetz (2003) lançaram mão da análise estatística da probabilidade de distribuição randômica de eventos, descrita em 1837 por um matemático francês chamado Siméon Denis Poisson, conhecida como Distribuição de Poisson, para correlacionar os títulos virais obtidos por PFU e MTT. Assim, o valor de PFU seria igual ao título obtido por MTT multiplicado por 0,69. Neste trabalho, o título obtido de PFU de acordo com esta fórmula foi de $1,09E+09$ PFU/ml. Isso demonstra que, apesar dos valores obtidos por PFU e MTT parecerem distantes entre si, ao serem estatisticamente corrigidos pela fórmula de Poisson, estão relativamente próximos, indicando que ambos os métodos poderiam ser utilizados em pesquisas futuras para cálculo de título viral.

Atualmente existem diversos outros métodos para determinação do número de partículas virais em uma amostra como a microscopia eletrônica de transmissão (Steffens, 1998), o TRPS (*tunable resistive pulse sensing*) (ROBERTS et al., 2012), a citometria de fluxo (STOFFEL et al., 2005), a PCR quantitativa (qPCR) (O'LEARY et al., 2003), também chamada de PCR em tempo real e o ensaio enzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (KUBY et al., 2007). Todos apresentam vantagens e desvantagens e, talvez, alguns sejam até executados mais rápido que o teste de PFU e MTT, porém, esses testes ainda possuem a desvantagem de ser de alto custo quando comparados aos métodos tradicionais.

Uma vez realizado o título viral, prosseguiu-se com a identificação da presença do genoma viral nas culturas trabalhadas nesse estudo. Para tanto, utilizamos o PCR como ferramenta para esse objetivo. Dessa forma, identificamos o RNA em ambas as culturas o que nos impeliu à análise mais detalhada da resposta dos astrócitos frente à infecção com SLEV.

Uma forma confiável e consistente de avaliar a resposta astrocitária envolve a observação de alterações morfológicas que incluem a maior frequência e espessura dos filamentos intermediários e, conseqüentemente, de proteínas constitutivas desses processos, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), de forma que astrócitos ativados apresentam uma expressão robusta de GFAP (PEKNY et al., 2014; MIDDLEDORP et al. 2011). Em seus experimentos Mishra et al. (2007) observaram que no grupo controle (sem vírus) os astrócitos possuíam características morfológicas de astrócitos em repouso. Quatro dias pós-infecção por JEV, os processos astrocitários se mostraram mais longos e espessos, um padrão associado à ativação astrocítica ou astrogliose, além de um aumento na expressão de GFAP. De dois a quatro dias pós-infecção, houve um aumento significativo na quantidade de astrócitos ativados. De modo semelhante, neste estudo foi mostrado que a invasão dos astrócitos pelo SLEV desencadeia astrogliose com acentuada expressão de GFAP e aumento da densidade de prolongamentos citoplasmáticos destas células em concentrações virais inferiores à concentração não diluída de vírus onde se observa hipertrofia astrocitária com aumento no número e espessura de prolongamentos citoplasmáticos, característicos de sua ativação.

Chen et al. (2010) afirmaram que astrócitos não foram afetados significativamente em sua morfologia após infecção por JEV, por outro lado, Mishra et al. (2007) observaram efeitos citopáticos em culturas de astrócitos após quatro dias de infecção por JEV. Em nossas culturas de astrócitos, foi observado efeito citopático após seis dias de infecção por SLEV somente quando utilizada a concentração não diluída de vírus, já nas outras culturas, em que foram incubadas concentrações relativamente inferiores, não foram observadas alterações

morfológicas compatíveis com dano celular. Além disso, observamos que a infecção de astrócitos por SLEV, confirmada pela análise imunocitoquímica, ativa a via apoptótica dependente de caspase-3 nestas células. A quantificação de células positivas para caspase-3 clivada revelou que a concentração não diluída de SLEV causa aumento da morte celular programada e que concentrações menores respondem à infecção também com significativo aumento de caspase-3, porém, com menor intensidade. Confirmando, juntamente com outros resultados, como a identificação de MIAF anti-SLEV no interior celular que é muito baixa em diluições mais altas de vírus, que os astrócitos são células resistentes à infecção por SLEV.

Diniz et al. (2006), por sua vez, mostraram que, após infecção por WNV, a cultura primária de astrócitos demonstrou efeitos citopáticos com alterações morfológicas leves a partir do oitavo dia pós-infecção, se estabilizando por volta do 30º dia. E que os astrócitos infectados assumiram uma morfologia alongada com grandes prolongamentos citoplasmáticos antes de sua morte. Segundo esses autores, no quarto dia pós-infecção, aproximadamente 30% das células remanescentes estavam em apoptose de acordo com a coloração de TUNEL. Diante de seus resultados, esses autores concluíram que a infecção de astrócitos por WNV ocorre de forma lenta e algumas células não demonstram sinais de infecção podendo ser cultivadas com sucesso por até 114 dias e apresentando produção de partículas virais infecciosas, porém sem alterações citopáticas, mantendo, portanto, um estado de infecção persistente e permissivo. Sugerindo que os astrócitos poderiam, então, ser responsáveis por infecções virais crônicas ou persistentes devido a manutenção do WNV no CNS. Este fato também foi confirmado por Hussmann et al. (2012) que afirmaram que a susceptibilidade reduzida do astrócito ao WNV ocorre devido ao atraso na replicação do genoma viral e a redução da infecção célula-célula dependente de interferon. Nesse sentido, os astrócitos poderiam regular a disseminação de WNV no CNS e, por isso, são um alvo para a melhora da neuropatologia do WNV.

Em nosso estudo foram observadas alterações morfológicas em astrócitos semelhantes às descritas por Diniz et al. (2006). Após seis dias de infecção com $7,7E+08$ PFU/ml (sem diluição) encontramos 79,85% de astrócitos não viáveis. Uma taxa de mortalidade de 50% dos astrócitos em cultura foi observada em uma concentração entre $7,5E-01$ a $5,0E-01$. Já, quando observamos as células VERO, a taxa de mortalidade de 50% de células ocorre com a concentração de $1,0E-03$, demonstrando que, de fato, existe uma grande resistência dos astrócitos frente à infecção por SLEV. Futuros trabalhos precisam ser feitos para verificar a existência de um padrão de infecção crônica de SLEV em astrócitos semelhante aos estudos

com WNV referidos no parágrafo anterior, o que poderia justificar o longo período de recuperação pós-encefalite e sequelas decorrentes da enfermidade.

De forma semelhante a observada em nossos experimentos com SLEV, Diniz et al. (2006) observaram que a distribuição do WNV em astrócitos infectados também se dava numa localização perinuclear. Também em 2006, Uchil et al. observaram que uma porção significativa (20%) da atividade de RNA total dependente de RNA-polimerase (RdRp) em células infectadas por WNV, JEV e DENV encontravam-se no núcleo juntamente com as principais proteínas replicases NS3 e NS5 de JEV. Demonstrando, dessa maneira, demonstrou a localização e síntese de vRNA ocorrendo no núcleo. Em sua hipótese, o núcleo da célula hospedeira funcionaria como um sítio adicional para a presença de complexos ativos de replicase. Afim de entendermos a localização perinuclear de anticorpo anti-SLEV observada em nossos experimentos, futuros estudos necessitam ser realizados para verificar se também existe a presença e a síntese de vRNA no núcleo das células do CNS.

A baixa infectividade dos astrócitos por SLEV pode residir na capacidade dos astrócitos conviverem com o parasita intracelular em baixos títulos, sem que seja acionada a via apoptótica ou na variada função dessas células, destacando-se seu papel neuroprotetor no CNS, principalmente por ser fonte de produção de fatores neurotróficos e neurotrofinas (VILLOSLADA; GENAIN, 2004). Isso pode ser sugerido a partir de nossos achados que mostram culturas infectadas com baixas taxas de mortalidade mostrado tanto por MTT como por marcação anti-caspase 3 ativada, somente com algum comprometimento importante da viabilidade celular com concentrações cujo título viral não estava diluído ou diluído apenas uma vez. Mishra et al. (2007) afirmaram que astrócitos apresentavam aumento nos níveis de CNTF em encefalomielite disseminada aguda e de NGF nas encefalites virais, alterações associadas à neuroimunomodulação e neuroproteção. Segundo Chen et al. (2010), astrócitos infectados por JEV em animais e culturas primárias eleva a expressão de vários genes incluindo IL-6, MCP-1, RANTES, IP-10, GFAP, GLAST, GLT-1, NGF, CNTF e BDNF. Mishra et al. (2007) demonstraram que a infecção de astrócitos por JEV induziu a produção de fatores neurotróficos que reduzem o nível de espécies reativas de oxigênio que, sabidamente, contribuem para o estresse oxidativo e consequente produção de danos para as células pela oxidação de proteínas, DNA e lipídios.

Neste mesmo trabalho, os autores afirmam que a infectividade das células do CNS pelo JEV atingia as diferentes populações celulares da seguinte maneira: neurônios ~90%, micróglia ~80% e astrócitos ~20-30%. Adicionalmente, os mesmos autores relatam que a

morte neuronal por JEV foi acompanhada principalmente da ativação de micróglia, células que apresentam uma melhor competência imunológica quando comparada aos astrócitos (NEUMANN, 2001). Nesse contexto, foi relatado que o meio de cultura condicionado por micróglia causou maior neurotoxicidade ao neurônio do que o meio condicionado por astrócitos infectados. Todos esses achados corroboram com a hipótese de que ao ser infectados, os astrócitos ativam as vias de resposta imunológica com mobilização de células de defesa e vias de manutenção da homeostase para preservar a função neuronal. Assim, sua resistência à apoptose poderia ser interpretada como uma estratégia evolutiva que objetiva preservar ao máximo a função do CNS.

Flavivirus como WNV induzem à expressão na superfície celular de MHC-I, MHC-II e moléculas de adesão como ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e E-selectina (KESSON; CHENG; KING, 2002). As moléculas de MHC-I e MHC-II participam na ativação de linfócitos TCD8 e CD4, respectivamente, desencadeando resposta imune adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2013). Abraham e Manjunath (2006) relataram que moléculas de MHC-I apresentam regulação aumentada em astrócitos infectados por JEV, enquanto MHC-II permanece inalterado. Além disso, a expressão máxima de MHC-I na superfície de astrócitos se deu com 48h pós-infecção. Em nosso estudo, foi utilizado um período de incubação viral de seis dias e foi demonstrado que a infecção de astrócitos por SLEV, de maneira semelhante à observada com JEV, também desencadeia um aumento na expressão de MHC-I pelos astrócitos, principalmente nas culturas infectadas com concentrações virais mais elevadas como observado nas Figuras 7 e 9.

As proteínas das junções adesivas e zona oclusivas, claudinas e ocludina formam a base estrutural de integridade da BBB, possuindo papel importante em seu funcionamento (HUSSMANN et al., 2012). Verma et al. (2010) observaram que astrócitos corticais expressavam múltiplas metaloproteinases (MMPs), proteínas pertencentes a grande família das endopeptidases, que exercem uma função primordial na migração leucocitária, modulação da atividade de citocinas e estão relacionadas à ruptura da BBB. Embora os níveis de expressão de MMP sejam baixos, em condições patológicas, as MMPs são sintetizadas pela maioria das células residentes do CNS. As MMP-1 e MMP-3, secretadas principalmente nas primeiras 24 horas pós-infecção por WNV, e a MMP-9, que aumenta no terceiro e quarto dias pós-infecção, secretadas por astrócitos, atuam sobre o endotélio da BBB acarretando em perda das proteínas das junções comunicantes. Estes dados sugerem que astrócitos, como uma das fontes de MMPs no cérebro, medeiam a quebra da BBB permitindo a entrada indiscriminada

de células do Sistema Imune no cérebro, contribuindo para a patogênese do WNV (VERMA et al., 2009; ROE et al., 2012).

Nossos resultados trouxeram novas perguntas sobre a interação entre astrócito e SLEV e, tendo a intenção de entendermos como se dá a invasão do vírus no CNS devemos nos preparar para passos futuros na direção de investigar a existência de infecção crônica de astrócitos por SLEV, assim como ocorre com WNV; se existem fatores que impedem a replicação do genoma viral no astrócitos com redução da infecção célula-célula dependente de interferon, como ocorre em WNV; se são formados complexos nucleares de replicase flaviviral de SLEV assim como descrito para JEV; se a infecção por SLEV aumenta a expressão gênica de IL-6, MCP-1, RANTES, IP-10, GLAST, GLT-1, NGF, CNTF e BDNF, bem como da regulação de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam estresse oxidativo neuronal; qual o grau de infectividade de SLEV para cada célula do CNS; se a infecção por SLEV causa aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e E-selectina; e se existe aumento da produção de MMPs decorrente da infecção de astrócitos por SLEV, assim como ocorre em WNV, ocasionando quebra da BBB pela perda das proteínas das junções comunicantes, da zona de oclusão e de adesão.

.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi observado que embora exista grande resistência à infecção por SLEV, os astrócitos são células susceptíveis ao vírus.

Ao penetrar os astrócitos o SLEV migra para uma região perinuclear, onde se dará o processo de replicação viral.

Os astrócitos respondem à infecção com ativação celular, caracterizada por hipertrofia que se traduz principalmente pelo aumento da expressão de GFAP, visivelmente localizado nos prolongamentos citoplasmáticos e corpo celular.

Ocorre aumento na expressão de MHC-I e ativação da via apoptótica caspase-3 dependente que culminará em destruição nuclear e morte celular que é mais evidente em altas concentrações virais.

Além disso, foi observado que astrócitos também são susceptíveis ao Oropouche vírus que, desencadeia nestas células, respostas semelhantes à causada pela infecção por SLEV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **IMUNOLOGIA BÁSICA**. 4 ed.. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2013.

ABRAHAM, S.; MANJUNATH, R. Induction of classical and nonclassical MHC-I on mouse brain astrocytes by Japanese encephalitis virus. **Virus research**, v. 119, n. 2, p. 216–20, 2006.

AUGUSTE, A. J.; PYBUS, O. G.; CARRINGTON, C. V.; Evolution and dispersal of St. Louis encephalitis virus in the Americas. **Infect Genet Evol**, v. 9, p. 709, 2009.

BAILLIE, G. J.; KOLOKOTRONIS, S. O.; WALTARI, E. *et al.* Phylogenetic and evolutionary analyses of St. Louis encephalitis virus genomes. **Mol Phylogenet Evol**, v. 47, p. 717, 2008.

BALEOTTI, F.G.; MORELI, M.; FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.141-147, 2003.

BARROS, V. E. D.; FERREIRA, B. R.; LIVONESI, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with brazilian flaviviruses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 3, p. 141–147, 2009.

BAUER, J.; HUITINGA, I.; ZHAO, W.; LASSMANN, H.; HICKEY, W. F.; DIJKSTRA, C. D. The role of macrophages, perivascular cells and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Glia**, v. 15, p. 437–446, 1995.

BI, Z.; BARNA, M.; KOMATSU, T.; REISS, C. S. Vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system activates both innate and acquired immunity. **J.Virol.**, v. 69, p. 6466–6472, 1995.

BRINKER, K. R.; MONATH, T. P. The acute disease. In: Monath, T.P. (Coord.), **St. Louis Encephalitis**. Washington, DC: American Public Health Association, 1980. p.503.

BRINTON, M. A.; DISPOTO, J. H. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. **Virology**, v. 162, n. 2, p. 290-299, fev., 1988.

BRONZONI, R. V. DE M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696–702, 2005.

BURLESON, F. G.; CHAMBERTS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. Virology: a laboratory manual. San Diego: Academic, 1992. 250 p.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **The Journal of general virology**, v. 70 (Pt 1), p. 37–43, 1989.

CHAUHAN, V. S.; FURR, S. R.; STERKA, D. G. JR.; NELSON, D. A.; MOERDYK-SCHAUWECKER, M.; MARRIOTT, I.; GRDZELISHVILI, V. Z. Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses. **Virology**, v. 10, p. 187–196, 2010.

CHÁVEZ, J. H.; REIS, V. P. DOS; SILVA, J. R.; et al. Production and diagnostic application of recombinant domain III of West Nile envelope protein in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 97–99, 2013.

CHEN, C.-J.; OU, Y.-C.; LIN, S.-Y.; et al. Glial activation involvement in neuronal death by Japanese encephalitis virus infection. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 4, p. 1028–37, 2010.

CHU, C. T.; HOWELL, D. N.; MORGENLANDER, J. C.; et al. Electron microscopic diagnosis of human flavivirus encephalitis: use of confocal microscopy as an aid. **The American journal of surgical pathology**, Oct. 1999.

CIOTA, A. T.; PAYNE, A. F.; NQO, K. A.; KRAMER, L. D. Consequences of in vitro host shift for St. Louis encephalitis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 95, n. 6, p. 1281–1288, jun., 2014.

DÍAZ, L. A.; LLINÁS, G.; VÁZQUEZ, A.; TENORIO, A.; CONTIGIANI, M. S. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1489, 2012.

DINIZ, J. A.; ROSA, A. P. DA; GUZMAN, H.; et al. West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: the role of astrocytes in chronic infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 4, p. 691–696, 2006.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v. 36, p. 180–190, 2001.

FIGUEIREDO, L.T.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FIORILLO, A.M. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v.20, n.3, p.204-211, 1986.

FISCHER, H. G.; REICHMANN, G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2717–2726, 2001.

FURR, S. R.; MARRIOTT, I. Viral CNS infections: role of glial pattern recognition receptors in neuroinflammation. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, jun. 2012.

GARDNER, J. J.; REYES, M. G. Pathology. In: Monath, T.P. (Coord.), **St. Louis Encephalitis**. Washington, DC: American Public Health Association, 1980. p.551.

GONZALEZ-HERNANDEZ, M. B.; BRAGAZZI CUNHA, J.; WOBUS, C. E. Plaque Assay for Murine Norovirus. **Journal of Visualized Experiments**, n. 66, p. e4297, 2012.

GRAENTZDOERFFER, A.; NEMETZ, C. High-throughput expression-PCR using universal plasmid-specific primers. **Biotechniques**, v. 34, n. 2, p. 256–258, 2003.

HUSSMANN, K. L.; SAMUEL, M. A; KIM, K. S.; DIAMOND, M. S.; FREDERICKSEN, B. L. Differential replication of pathogenic and nonpathogenic strains of West Nile virus within astrocytes. **Journal of virology**, v. 87, n. 5, p. 2814–22, 2013.

IMAI, T. et al. Us3 kinase encoded by herpes simplex virus 1 mediates downregulation of cell surface major histocompatibility complex class I and evasion of CD8+ T cells. **PloS One**, v. 8, n. 8, e72050, ago., 2013.

JOHNSON, A. J.; NOGA, A. J.; KOSOY, O. *et al.* Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, p. 566, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed.. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008, cap. 9, p. 161-166.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 1143, p. 1–20, 2008.

KESSON, A. M.; CHENG, Y.; KING, N. J. Regulation of immune recognition molecules by flavivirus, West Nile. **Viral Immunol.**, v. 15, n. 2, p. 273-283, 2002.

KIELIAN, T. Overview of toll-like receptors in the CNS. **Curr.Top. Microbiol.Immunol.**, v. 336, p. 1–14, 2009.

KRAMER, L. D.; CHANDLER, L. J. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. **Arch Virol**, v. 146, p. 2341, 2001.

KUBY, J.; KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Kuby Immunology**. W.H. Freeman and Company, ed. 6, 2007.

LEYSEN, P.; DE CLERQ, E.; NEYTS, J. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 67-82, 2000.

LIM, J. K.; LOUIE, C. Y.; GLASER, C. *et al.* Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. **J Infect Dis**, v. 197, p. 262, 2008.

LIU, M. L.; HSU, C. Y. Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. **Cell Tissue Res.**, v. 293, p. 389-394, 1998.

LUBY, J. P.; MURPHY, F. K.; GILLIAM, J. N. *et al.* Antigenuria in St. Louis encephalitis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 29, p. 265-268, 1980.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **The Journal of cell biology**, v. 139, n. 3, p. 729–34, 1997.

MAHARAJ, P. D.; ANISHCHENKO, M.; LANGEVIN, S. A.; *et al.* Structural gene (prME) chimeras of St Louis encephalitis virus and West Nile virus exhibit altered in vitro cytopathic and growth phenotypes. **The Journal of general virology**, v. 93, n. 1, p. 39–49, 2012.

MARTIN, D. A.; NOGA, A.; KOSOY, O. *et al.* Evaluation of a diagnostic algorithm using immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human West Nile

Virus and St. Louis Encephalitis virus infections during the 2002 West Nile Virus epidemic in the United States. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, p. 1130, 2004.

MAY, F.J.; LI, L.; ZHANG, S. *et al.* Genetic variation of St. Louis encephalitis virus. **J Gen Virol**, v. 89, p. 1901, 2008.

MCCANDLESS, E. E.; ZHANG, B.; DIAMOND, M. S.; KLEIN, R. S. CXCR4 antagonism increases T cell trafficking in the central nervous system and improves survival from West Nile virus encephalitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, p. 11270, 2008.

MCCARTHY, K. D.; DE VELLIS, J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. **J. Cell. Biol.**, v. 85, p. 890-902, jun. 1980.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011. Elsevier Ltd.

MISHRA, M. K.; KOLI, P.; BHOWMICK, S.; BASU, A. Neuroprotection conferred by astrocytes is insufficient to protect animals from succumbing to Japanese encephalitis. **Neurochemistry international**, v. 50, n. 5, p. 764–73, 2007.

MONATH, T. P. Epidemiology. In: Monath, T. P. (Coord.). **St. Louis Encephalitis**. Washington, DC: American Public Health Association, 1980. p. 239.

MONATH, T. P. **Saint Louis Encephalitis**. Waltham, MA: Up To Date, 2012.

MONATH, T. P.; CROPP, C. B.; HARRISON, A. K. Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system: reinvestigation of an old controversy. **Lab. Investig.**, v. 48, p. 399-410, 1983.

MONATH, T. P.; TSAI, T. F. Flaviviruses. In: RICHMAN, D. D. (Coord.). **Clinical virology**. Washington, DC: ASM Press, 2002, cap. 51, p. 1097-1151.

MONATH, T. P.; TSAI, T. F. St. Louis encephalitis: lessons from the last decade. **Am J Trop Med Hyg**, v. 37, p. 40S, 1987.

MONDINI, A.; CARDEAL, I. L.; LÁZARO, E. *et al.* Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 13, p. 176, 2007.

MOTA, E. F.; LIMA, M. DA G. S.; MELO, D. F. DE. Immunological adjuvants: recent advances and perspectives. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79–88, 2006.

MUHAMAD, M.; KEE, L. Y.; RAHMAN, N. A.; YUSOF, R. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on dengue virus type-2. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 3, p. 294–302, 2010.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

MULLER, V. D. M.; RUSSO, R. R.; OLIVEIRA CINTRA, A. C.; et al. Crotoxin and phospholipases A 2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507–515, 2012. Elsevier Ltd.

NEUMANN, H. Control of Glial Immune Function. **GLIA**, v. 36, p. 191–199, Maio, 2001.

NORKIN, L. C. **Virology: molecular biology and pathogenesis**, Washington, DC: ASM Press, 2010, cap. 10, p. 269.

NOTIFIABLE diseases and mortality tables weekly. Centers for Disease Control, Atlanta, GA, v. 63, n. 34, ND-466-ND-479, 29 ago. 2014. Disponível em: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6334md.htm?s_cid=mm6334md_w. Acesso em: 29 ago. 2014.

O'LEARY, J.J.; SHEILS, O.; MARTIN, C.; CROWLEY, A. Taqman Technology and Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: CROCKER, J.; MURRAY, P.G. **Molecular Biology in Cellular Pathology**. John Wiley and Sons. p. 251–268.

PARQUET, M. C.; KUMATORI, A.; HASEBE, F.; MATHENGE, E. G.; MORITA, K. St. Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. **Arch Virol**, v. 147, n. 6, p. 1105–1119, 2002.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; TAVARES, F. N.; COSTA, E. V. DA; et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. September, p. 829–833, 2010.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience Letters**, 2014. Elsevier Ireland Ltd.

POWELL, K. E.; BLAKEY, D. L. St. Louis encephalitis: clinical and epidemiologic aspects, Mississippi, 1974. **South Med J**, v. 69, p. 1121, 1976.

PUGACHEV, K. V.; GUIRAKHOO, F.; MITCHELL, F. *et al.* Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, p. 639, 2004.

RAO, J. S.; KELLOM, M.; KIM, H.-W.; RAPOPORT, S. I. Neuroinflammation and synaptic loss. **Neurochem. Res.**, v. 37, n. 5, p. 903–910, 2012.

RASLEY, A.; BOST, K. L.; MARRIOTT, I. Murine gammaherpesvirus-68 elicits robust levels of interleukin-12 p40, but not interleukin-12 p70 production, by murine microglia and astrocytes. **J. Neurovirol.**, v. 10, p. 171–180, 2004.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

REEVES, W. C. **Epidemiology and control of mosquito-borne arboviruses in California**. Sacramento, CA: California Mosquito Vector Control Association, 1943–1987.

REINA, M.C.F.P.; FREITAS, A.C.; FERNANDES, F.C.; SILVA, J.A.M.; GARCIA, M.H.O.; LISE, M.L.Z.; KATZ, G.; SPINOLA, R. Investigação de casos de encefalite viral de Saint Louis notificados no município de São José do Rio Preto. Centro De Vigilância Epidemiológica de São Paulo.

REISEN, W. K.; FANG, Y.; MARTINEZ, V. M. Avian host and mosquito (*Diptera: Culicidae*) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. **J Med Entomol**, v. 42, p. 367, 2005.

REISEN, W. K.; LOTHROP, H. D.; WHEELER, S. S. *et al.* Persistent West Nile virus transmission and the apparent displacement St. Louis encephalitis virus in southeastern California, 2003-2006. **J Med Entomol**, v. 45, p. 494, 2008.

ROBERSON, J. A.; CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Differentiation of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections by use of noninfectious virus-like particles with reduced cross-reactivity. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 3167, 2007.

ROBERTS, G. S. *et al.* Tunable pores for measuring concentrations of synthetic and biological nanoparticle dispersions. **Biosens. Bioelectron.** v. 31, n. 1, p. 17-25, jan., 2012.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L.; BISORDI, I.; *et al.* St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005.

RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R. T.; CASSEB, S. M. M.; *et al.* Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **The Journal of general virology**, v. 91, n. 10, p. 2420-2427, 2010.

ROE, K.; KUMAR, M.; LUM, S. *et al.* West Nile vírus induced disruption of blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. **J Gen Virol**, v. 93, p. 1193-1203, jun., 2012.

ROMANO-LIBER, N.S.; IVERSSON, L.B. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.3, p.236-242, 2000.

SAMUEL, M. A.; MORREY, J. D.; DIAMOND, M. S. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. **J Virol**, v.81, p. 2614, 2007a.

SAMUEL, M. A.; WANG, H.; SIDDHARTHAN, V. *et al.* Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, p. 17140, 2007b.

SEJVAR, J. J.; BODE, A. V.; CURIEL, M.; MARFIN A. A. Post-infectious encephalomyelitis associated with St. Louis encephalitis virus infection. **Neurology**, v. 63, p. 1719, 2004.

SHELLAN, G. R.; SANGSTER, M. Y.; UROSEVIC, N. Genetic control of host resistance to flavivírus infection in animals. **Rev. Sci. Technol.**, v. 17, p. 231-248, 1998.

SHRESTHA, B.; NG, T.; CHU, H. J. *et al.* The relative contribution of antibody and CD8+ T cells to vaccine immunity against West Nile encephalitis virus. **Vaccine**, v. 26, p.2020, 2008.

SIEUWERTZ, A. *et al.* MTT tetrazolium salt assays scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC 50 – values and cell survival. **European Journal Of Clinical Chemistry**, p. 813-823. 1995.

SIIRIN, M. T.; DUAN, T.; LEI, H.; *et al.* Chronic St. Louis encephalitis virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 2, p. 299–306, 2007.

SOWERBY, S. J.; BROOM, M. F.; PETERSEN, G. B. Dynamically resizable nanometre-scale apertures for molecular sensing. **Sensors and actuators B: Chemical**, v. 123, n. 1, p. 325-330, 2007.

SPINSANTI, L. I.; DÍAZ, L. A.; GLATSTEIN, N. *et al.* Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. **J Clin Virol**, v. 42, p. 27, 2008.

STEFFENS, W. L. Use of Transmission Electron Microscopy for Viral Diagnosis in Psittacine Birds. **Proceedings of International Virtual Conferences in Veterinary Medicine: Diseases of Psittacine Birds**, Athens, Georgia, 1998.

STOFFEL, C.L.; FINCH, R.; CHRISTENSEN, K.; EDWARDS, D.; ROWLEN, K.L. Rapid Determination of Baculovirus Titer by a Dual Channel Virus Counter. **American Biotechnology Laboratory**, v. 37, n. 22, p. 24-25, 2005.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog. Neurobiol**, v. 58, p. 233–247, 1999.

SUEN, W. W.; PROW, N. A; HALL, R. A; BIELEFELDT-OHMANN, H. Mechanism of west nile virus neuroinvasion: a critical appraisal. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2796–825, 2014.

SUZUKI, M.; PHILLIPS, C. A. St. Louis encephalitis. A histopathologic study of the fatal cases from the Houston epidemic in 1964. **Arch Pathol**. v. 81, p. 47, 1966.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **J Virol Methods**, v. 33, n. 1-2, p. 61-71, 1991.

TRENT, D. W.; MONATH, T. P.; BOWEN, G. S. *et al.* Variation among strains of St. Louis encephalitis virus: basis for a genetic, pathogenetic, and epidemiologic classification. **Ann N Y Acad Sci**, v. 354, p. 219, 1980.

TSAI, T. F. Arboviral infections in the United States. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 5, p. 73-102, 1991.

UCHIL, P. D.; KUMAR, A. V. A; SATCHIDANANDAM, V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. **Journal of virology**, v. 80, n. 11, p. 5451–64, 2006.

VANDERGAAS, R.; FREDERICKSEN, B. L. West Nile virus (WNV) replication is independent of autophagy in mammalian cells. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45800, 2012.

VERMA, S.; KUMAR, M.; GURJAV, U.; LUM, S.; NERURKAR, V. R. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. **Virology**, v. 397, n. 1, p. 130–138, 2010.

VERMA, S.; KUMAR, M.; NERURKAR, V. R. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks the production of West Nile virus-induced neuroinflammatory markers in astrocytes. **The Journal of general virology**, v. 92, n. 3, p. 507–515, 2011.

VERMA, S.; LO, Y.; CHAPAGAIN, M. *et al.* West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. **Virology**, v. 385, n. 2, p. 425-433, mar., 2009.

VILLOSLADA, P; GENAIN, C. P. Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation. **Prog. Brain Res.**, v. 146, p. 403-414, 2004.

WANG, T.; TOWN, T.; ALEXOPOULOU, L. *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nat Med**, v. 10, p. 1366, 2004.

WOOTTON, S. H.; KAPLAN, S. L.; PERROTTA, D. M. *et al.* St. Louis encephalitis in early infancy. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, p. 951, 2004.

YANG, C.-M.; LIN, C.-C.; LEE, I.-T.; *et al.* Japanese encephalitis virus induces matrix metalloproteinase-9 expression via a ROS/c-Src/PDGFR/PI3K/Akt/MAPKs-dependent AP-1 pathway in rat brain astrocytes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 12, 2012. BioMed Central Ltd.

YONEYAMA, M.; FUJITA, T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. **Rev.Med.Virol.**, v. 20, p. 4–22, 2010.

ZUO, J. *et al.* Epstein-Barr virus evades CD4⁺ T cell responses in lytic cycle through BZLF1-mediated downregulation of CD74 and the cooperation of vBcl-2. **Plos Pathog.**, v. 7, n. 12, e1002455, dez., 2011.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 237/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 148/13

Projeto Pesquisa: “ANÁLISE DA INFECÇÃO DE ASTRÓCITOS EM CULTURA
PELO VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS”

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da
pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 09 de Janeiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Para o cálculo do título viral por MTT é preciso:

- 1) Determinar o cut-off do teste com base no controle celular.
- 2) Estabelecer quais os poços positivos e negativos de acordo com o cut-off
- 3) Aplicar o método de Reed e Muench para o cálculo do título viral.

$$\text{CUT-OFF} = \text{média das absorbâncias do controle celular} - 2X \text{ DP}$$

Depois de aplicar o método de Reed e Muench, ajustar o título ao volume de 1000uL, sempre considerando que o título encontrado será correspondente ao volume da diluição utilizada no experimento. Por exemplo: O ensaio de MTT foi realizado com 200uL das diluições virais. O título encontrado foi $10^{8,5}$ em 200uL, já em 1000uL o título é de $5 \times 10^{8,5}$ TCID₅₀/mL. É dessa forma que se deve expressar o título.

Para calcular Reed e Muench é preciso ter no mínimo 4 amostras de cada diluição viral. Depois de saber quais os poços positivos e negativos, deve-se preencher a seguinte tabela para o cálculo:

Diluição viral	negativo	positivo	negativo	positivo	Razão	Taxa (%)
10^{-1}	6	0	48	0	48/48	100
10^{-2}	6	0	42	0	42/42	100
10^{-3}	6	0	36	0	36/36	100
10^{-4}	6	0	30	0	30/30	100
10^{-5}	6	0	24	0	24/24	100
10^{-6}	6	0	18	0	18/18	100
10^{-7}	6	0	12	0	12/12	100
10^{-8}	4	2	6	2	6/8	75*
10^{-9}	2	4	2	6	2/8	25
10^{-10}	0	0	0	6	0/6	0



Esta seta indica o sentido da soma das linhas da tabela. Na razão, soma-se os negativos acumulados (soma da primeira coluna) e divide-se pela soma dos negativos e positivos acumulados (soma da segunda coluna). Isso resultará na taxa, onde deve-se encontrar o valor das diluições mais próximas a 50%. * na tabela, a diluição que infecta 50% das células está entre -9 e -10 (75% e 25% respectivamente).

Depois aplicar a fórmula para o cálculo da dist. proporcional:

$$X = \text{Diluição acima de 50\%} - 50$$

$$\text{Diluição acima de 50\%} - \text{diluição abaixo de 50\%}$$

Por exemplo: $X = 75 - 50 / 75 - 25 = 25 / 50 = 0,5$. Portanto $X = 0,5$

TCID₅₀ = Log. Dil. Acima de 50% + X = $8 + 0,5 = 8,5$

TCID₅₀ = $10^{-8,5}$ (considerar a diluição usada no experimento)

Por ex.: se foi 200uL, o título é $5 \times 10^{-8,5}$ TCID₅₀/ mL ou em 1000uL.