

# Infeção persistente pelo vírus Ilheus em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*)

## Persistent infection by *Ilheus virus* in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*)

Daniele Freitas Henriques<sup>1</sup>, Juarez Antonio Simões Quaresma<sup>2,3</sup>, Helen Thais Fuzii<sup>2</sup>, Eliana Vieira Pinto da Silva<sup>1</sup>, Tinara Leila Sousa Aarão<sup>2</sup>, Raimunda do Socorro da Silva Azevedo<sup>1</sup>, Samir Manssor Moraes Casseb<sup>1</sup>, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Ananindeua, Pará, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Belém, Pará, Brasil

<sup>3</sup>Universidade do Estado do Pará, Departamento de Patologia, Belém, Pará, Brasil

### RESUMO

**Introdução:** O vírus Ilheus (VILH) é um arbovírus de ocorrência no Brasil, pertencente a família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, enquadrado clinicamente como encefalitogênico. Estudos de infecções experimentais com alguns flavivírus demonstraram que esses possuem capacidade de causar persistência da infecção. **Objetivo:** Investigar a infecção persistente pelo VILH em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). **Materiais e Métodos:** Os hamsters foram infectados por via intraperitoneal com VILH (9,6 DL<sub>50</sub>/0,02 mL), sendo, por um período de até 120 dias pós-inoculação (d.p.i.), anestesiados e sacrificados para coleta de amostras de sangue, urina e tecidos. Títulos virais para o VILH foram quantificados por transcrição reversa seguida de reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) nas amostras biológicas, e as mesmas foram utilizadas para infectar células VERO, com confirmação da replicação viral por imunofluorescência. Níveis de anticorpos totais no soro foram determinados pela técnica inibição da hemaglutinação, as alterações teciduais observadas por meio do exame histopatológico corado por hematoxilina-eosina e detecção de antígenos virais por imuno-histoquímica. **Resultados:** O VILH induziu forte resposta imune, demonstrou ser patogênico para hamsters, causando invasão neuronal, foi isolado em células VERO de vísceras, cérebro, sangue, soro e urina dos hamsters infectados e detectado por qRT-PCR no cérebro, fígado e sangue com 30, seis e 15 d.p.i., respectivamente. As alterações histopatológicas e a expressão de antígenos virais, nas amostras de fígado, rim e pulmão, ocorreram com 30 d.p.i.; e no cérebro, até quatro meses pós-inoculação. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostraram que o VILH é patogênico para hamsters dourados e tem capacidade de causar infecção persistente em hamsters infectados por via periférica.

**Palavras-chave:** Vírus Ilheus; *Flavivirus*; Infecção Persistente; Hamsters Dourados.

### ABSTRACT

**Introduction:** *Ilheus virus* (ILHV) is a Brazilian arbovirus belonging to the *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus. The virus is clinically classified as encephalitogenic, and is known to cause infection persistence. **Objective:** To investigate persistent infection by ILHV in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Materials and Methods:** Hamsters were infected intraperitoneally with ILHV (9.6 LD<sub>50</sub>/0.02 mL), anaesthetised, and sacrificed up to the 120th day post-infection, for blood, urine, and tissue sampling. Viral titers were measured for ILHV using reverse transcription followed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) performed on biological samples, which were used to infect VERO cells; viral replication was confirmed by immunofluorescence. Serum antibody levels were determined using hemagglutination inhibition technique; tissue alterations were observed through histopathological examination of hematoxylin-eosin-stained tissues; viral antigens were detected using immunohistochemistry. **Results:** A strong immune response was induced by ILHV, in addition to its pathogenicity in hamsters and neural invasion. The virus was isolated from VERO cells in the viscera, brain, blood, serum, and urine of infected hamsters and detected by qRT-PCR in the brain, liver, and blood at 30, six, and 15 days post-infection, respectively. Histopathological alterations and detection of viral antigens in the liver, kidney, and lung samples occurred 30 days after infection; in the brain, they were detected up to four months after infection. **Conclusion:** These results indicate that ILHV is pathogenic to golden hamsters and causes persistent infection in peripherally infected hamsters.

**Keywords:** *Ilheus virus*; *Flavivirus*; Persistent Infection; Golden Hamsters.

### Correspondência / Correspondence:

Daniele Freitas Henriques

Instituto Evandro Chagas, Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas

Rodovia BR-316 km 7, s/n. Bairro: Levilândia – CEP: 67030-000 – Ananindeua, Pará, Brasil – Tel.: +55 (91) 3214-2296

E-mail: danielehenriques@iec.pa.gov.br

## INTRODUÇÃO

O arbovírus Ilheus (VILH) é um flavivírus (família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*) de grande importância para a saúde pública no Brasil, por estar relacionado a casos de encefalites em humanos, sendo o arbovírus encefalitogênico o mais distribuído no País, em particular na Amazônia brasileira. Entretanto, a doença em humanos é observada esporadicamente, embora o quadro clínico varie desde infecções assintomáticas até encefalite, a maioria dos casos é classificada como uma doença febril<sup>1</sup>.

Após o isolamento original do VILH que foi obtido a partir de um lote misto de mosquitos *Aedes* spp. e *Psorophora* spp., capturados em Ilhéus, Estado da Bahia, em 1944<sup>2</sup>, esse vírus tem sido isolado sistematicamente em diferentes países da América do Sul e Central, especialmente no Brasil e Trinidad; bem como de diversas espécies de animais silvestres e artrópodes vetores, principalmente de *Psorophora ferox*, mas também, de modo esporádico, isolado de seres humanos<sup>3,4</sup>.

A prevalência de anticorpos para o VILH é amplamente distribuída em muitos países tropicais das Américas, entretanto epidemias não têm sido relatadas, provavelmente porque o principal vetor, *P. ferox*, apresenta hábitos silvestres. Populações humanas apresentam imunidade para o VILH, com taxas variando de 3,4% até 36%, sendo importante ressaltar o elevado percentual de positividade encontrado em áreas onde o vírus tem sido isolado. O número de casos clínicos com diagnóstico específico confirmado, no entanto, é baixo, em contraste com a alta prevalência de anticorpos para esse vírus, sugerindo que a maioria das infecções pode ser branda ou inaparente<sup>5</sup>.

Um estudo, realizado no Instituto Adolfo Lutz do Estado de São Paulo, relatou o isolamento do VILH e a detecção de anticorpos específicos em aves residentes, migratórias e de cativeiro, em saguis e quatis, comprovando a circulação desse agente no Parque Ecológico do Tietê, Estado de São Paulo. O comportamento migratório de aves silvestres pode determinar a introdução do vírus em outras regiões. Ao se observar a patogenicidade para o homem e a confirmação da circulação desse agente viral em área urbana, frequentada para atividade de lazer e de educação, o risco de ocorrência de infecção na população humana não pode ser descartado<sup>6</sup>, podendo ser considerado como um vírus potencialmente emergente.

Com os avanços na virologia moderna, foi possível observar que a infecção persistente viral ocorre comumente entre os flavivírus. Para um vírus causar infecção persistente ele deve diminuir ativamente a resposta imune antiviral do hospedeiro, por isso um importante efeito da replicação viral persistente está na desordem da homeostase normal do hospedeiro, causando a doença sem destruir a célula infectada<sup>7</sup>.

Em estudo experimental, Siirin et al<sup>8</sup> demonstraram que hamsters adultos, infectados com vírus da

encefalite Saint Louis (VESL), apresentaram infecção viral na urina por um período de tempo prolongado, despistando uma robusta resposta imune. Esses achados foram muito similares às descrições anteriores sobre infecções crônicas pelo vírus do Nilo Ocidental (VWN)<sup>9,10</sup>.

Sabe-se que outros flavivírus têm sido envolvidos com a infecção persistente *in vitro*, *in vivo* e em relatos clínicos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a possível ocorrência de infecção persistente *in vivo* do VILH, utilizando hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foi selecionado o VILH (BE H 7445), proveniente do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Essa amostra foi equivalente a quarta passagem em camundongos albinos suíços recém-nascidos, apresentando título de 9,6 DL<sub>50</sub>/0,02 mL.

Foram obtidos, do biotério do IEC, 45 hamsters dourados, fêmeas, de 2 a 3 semanas. A utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais do IEC.

A suspensão do VILH inoculada nos hamsters foi preparada a partir de cérebros de camundongos albinos suíços recém-nascidos, infectados com a amostra viral, macerados em solução salina tamponada (PBS), pH 7,4, contendo albumina bovina 0,75% e antibióticos. A suspensão foi inoculada em 30 hamsters pela via intraperitoneal, contendo aproximadamente 10<sup>2</sup>/0,1 mL unidades formadoras de placas preparadas em células VERO (células de rim de macaco verde africano), e 15 animais não inoculados formaram o grupo controle negativo. Três hamsters (dois infectados com a amostra viral e um do grupo controle) foram anestesiados a cada 24 h, por um período de sete dias e em intervalos de 15 dias, durante quatro meses (120 dias pós-inoculação – d.p.i.), sendo coletados sangue, urina, fígado, baço, rins, pulmões, coração e cérebro. As alíquotas de sangue, soro e urina foram armazenadas à temperatura de -70° C para estudos sobre a viremia, detecção de antígenos e/ou anticorpos. As vísceras e cérebro foram separados em duas partes, uma destinada à detecção de antígenos por imunofluorescência indireta (IFI) e titulação viral nos tecidos, sendo conservada à temperatura de -70° C; e outra para realização de estudo histopatológico e imunohistoquímico, sendo então fixada em solução de formalina tamponada a 10%.

Anticorpos específicos para o VILH foram detectados nos soros de hamsters coletados durante a cinética experimental, por meio do teste de inibição da hemaglutinação (IH)<sup>11,12</sup>. O antígeno usado foi preparado a partir de cérebros de camundongos albinos suíços recém-nascidos, infectados com o VILH pelo método de extração sucrose-acetona<sup>13</sup>. Os soros de hamsters foram testados por IH com diluições

seriadas de duas vezes de 1:20 a 1:5.120 contra quatro unidades hemaglutinantes do antígeno do VILH.

Os fragmentos de órgãos, sangue, soro e urina foram inoculados em células VERO, como descrito por Lennette<sup>14</sup>. Os inóculos foram preparados a partir de fragmentos de órgãos macerados, sendo realizada uma suspensão na proporção de 1:10 em PBS, pH 7,4, contendo albumina bovina 0,75% e antibióticos. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm durante 10 min a 4° C. O sobrenadante foi inoculado na proporção 1:100 em meio de manutenção. Os sangues, soros e urinas foram inoculados diretamente no meio de manutenção na proporção final de 1:50. Os espécimes inoculados foram observados diariamente em microscópio invertido (Olympus, modelo CK-2, Japão) para detecção de efeito citopático. A confirmação da infecção viral foi feita pelo teste de IFI de acordo com a técnica descrita por Tesh<sup>15</sup>.

A quantificação viral foi determinada a partir de sangue, fragmentos de cérebro e fígado coletados durante a cinética das infecções experimentais (três meses pós-inoculação para o VILH). Os resultados foram obtidos pela técnica transcrição reversa seguida de reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real (qRT-PCR), utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA). Após a extração do RNA viral das amostras em estudo com Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), a reação foi realizada com o kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen). Foi preparada uma reação final de 25 µL, contendo: 0,5 µL de SuperScript III RT Platinum Taq Mix, 0,2 µM de cada iniciador específico para o VILH que foram desenvolvidos para este estudo, ILHV/NS5R (5' – TGT ACC CAA GTT TCT GGA GT – 3') e ILHV/NS5F (5' – TTC TTG GAA TTT GAA GCA TT – 3'), 12,5 µL de 2x SYBR Green e 5 µL de RNA extraído das amostras em questão. A amplificação foi realizada seguindo as etapas: (i) transcriptase reversa (RT) a 50° C por 3 min; (ii) desnaturação a 95° C por 5 min; (iii) PCR em 40 ciclos, cada um contendo desnaturação a 95° C por 15 s, anelamento a 55° C por 1 min e extensão a 72° C por 30 s. Com a

temperatura dos amplicons específicos entre 79,8° C e -82,0° C.

Análises dos resultados de qRT-PCR foram realizadas por meio da curva padrão. Para obtenção dessa curva, o controle positivo do VILH foi previamente titulado por plaqueamento em células VERO, como descrito por Kuno<sup>16</sup>, para determinar o título que foi utilizado como referência para a diluição do RNA viral extraído do vírus controle. Em cada diluição, foi realizada a qRT-PCR para a construção da curva padrão e dessa foi retirada a equação para titulação da carga viral em unidades formadoras de placas por mL (PFU/mL).

Após a fixação em formalina, os fragmentos de vísceras (fígado, baço, rins, pulmões e coração) e tecido nervoso dos hamsters dourados passaram por banhos com concentrações crescentes de álcool, iniciando com álcool a 70%, progredindo até o etanol absoluto (100%); posteriormente, foram realizadas duas passagens em xilol à temperatura ambiente, seguida da imersão em dois banhos de parafina a 60° C. Por fim, a inclusão e formatação de blocos de parafina que, depois de resfriados, foram seccionados utilizando micrótomo rotativo (Jung Histocut 820, Leica), para obtenção de cortes de 5 µm de espessura, que foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE)<sup>17</sup> e pelo sistema da peroxidase para os procedimentos de imuno-histoquímica (IHQ), de acordo com o protocolo descrito por Carvalho et al<sup>18</sup>.

## RESULTADOS

Os 30 hamsters inoculados com a suspensão do VILH e os 15 hamsters utilizados como controle negativo permaneceram ativos e não apresentaram sinais de doenças durante a cinética experimental.

Os soros coletados durante a cinética apresentaram anticorpos IH a partir do quinto d.p.i. (1:320), com títulos crescentes até o título máximo (1:12.800), detectados no 15° d.p.i. para o VILH. Após esse evento, os anticorpos diminuíram até 45 d.p.i., permanecendo, sem muita alteração, no título de anticorpos até o final do experimento (quatro meses pós-inoculação). A cinética de anticorpos IH obtidos estão demonstrados na figura 1.

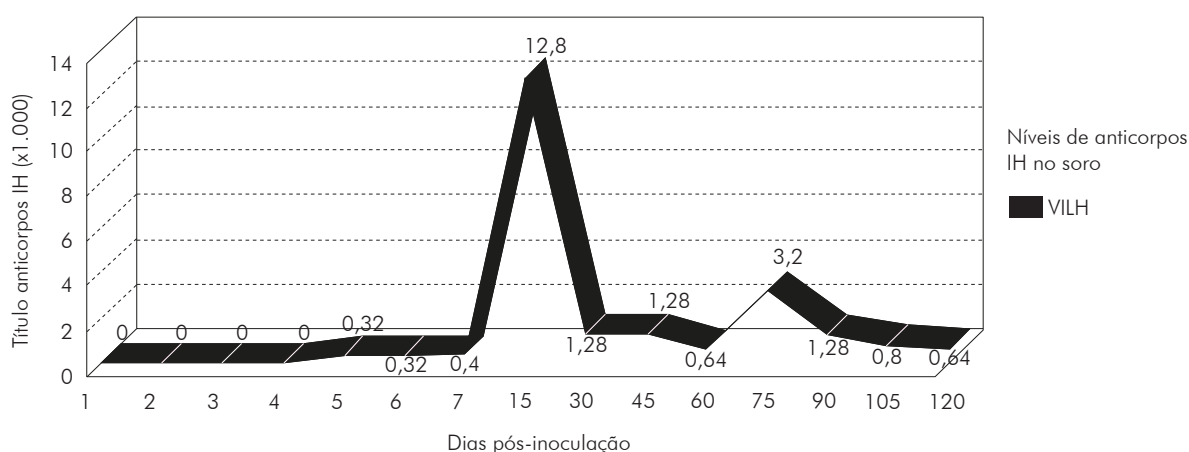


Figura 1 – Níveis de anticorpos específicos para o VILH nos soros de hamsters

Todas as amostras coletadas, durante a cinética com o VILH, com 1 d.p.i. em hamsters e inoculadas em células VERO, apresentaram antígenos para o vírus. Não foram observados antígenos do VILH nos sobrenadantes de células infectadas com urina, coletados com dois e três d.p.i. em hamsters. Os sobrenadantes de células inoculadas com amostras de sangue, soro e urina, coletados em quatro d.p.i. com VILH em hamsters, foram negativos para detecção de antígeno viral. Foi possível observar antígenos do VILH nos sobrenadantes de células inoculadas com amostras de rim, baço, pulmão, coração, cérebro e urina coletados com cinco e seis d.p.i. em hamsters infectados. Os sobrenadantes de células infectadas com rim, baço, pulmão, coração e cérebro, coletados com sete d.p.i. em hamsters, durante a cinética do

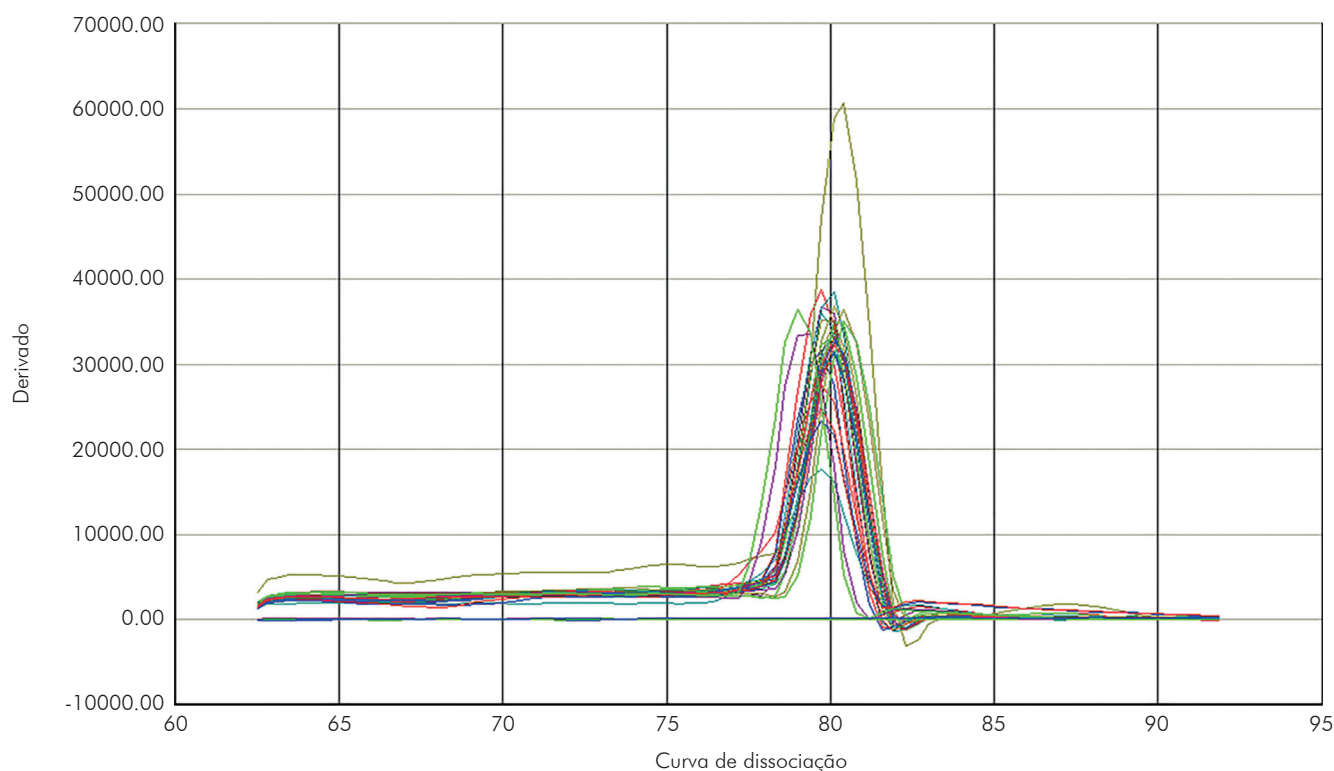
VILH, apresentaram resultado positivo para o soro homólogo do mesmo. A amostra de cérebro, coletada com 15 d.p.i. com VILH em hamster, e inoculada em sobrenadantes de célula foi a única a apresentar antígenos para o VILH. Todos os materiais biológicos, entre 30 e 120 d.p.i. com VILH em hamsters infectados, apresentaram resultado negativo para detecção de sobrenadantes de células; e também mostraram efeito citopático em células VERO, que foi caracterizado por destruição da monocamada celular devido à morte das células (Tabela 1).

A qRT-PCR mostrou-se altamente específica para o VILH. Na curva de dissociação os amplicons específicos mostraram temperatura entre 79,8° C e -82,0° C (Figura 2). As cepas mostraram um *cycle threshold* de 16,20 a 27,78 para o VILH (Figura 3).

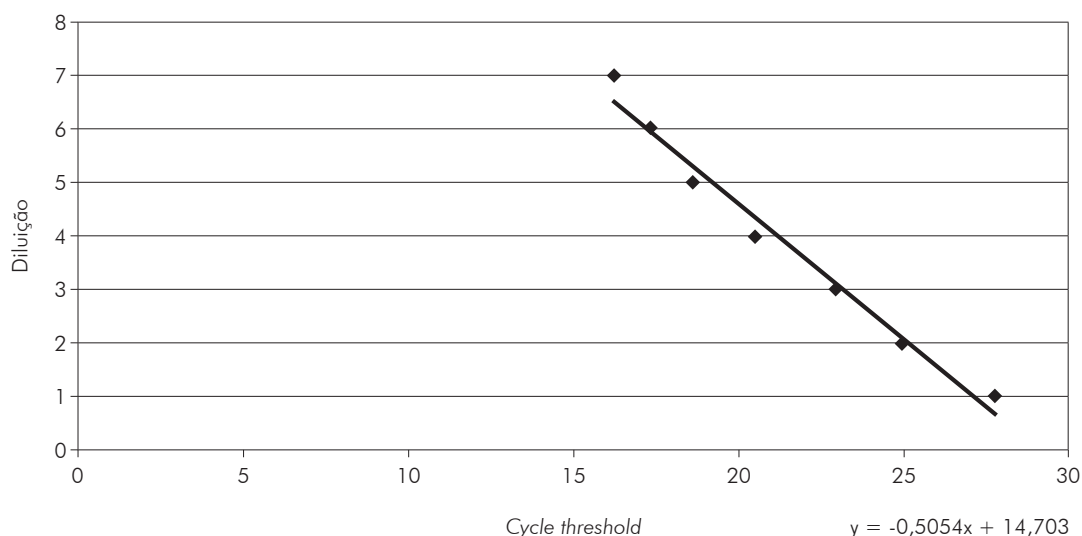
**Tabela 1** – Título do VILH, conforme a porcentagem de antígenos virais observado

Amostras VILH	1 d.p.i.	2 d.p.i.	3 d.p.i.	4 d.p.i.	5 d.p.i.	6 d.p.i.	7 d.p.i.	15 d.p.i.	30/120 d.p.i
Fígado	++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Rim	++	++	++	++	++	+++	+++	-	-
Baço	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Pulmão	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-
Coração	+	+++	++	++	+++	+++	++	-	-
Cérebro	++	++	++	++	+++	+	+	++	-
Sangue	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
Soro	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
Urina	n.i.	-	-	-	+	+	n.i.	-	-

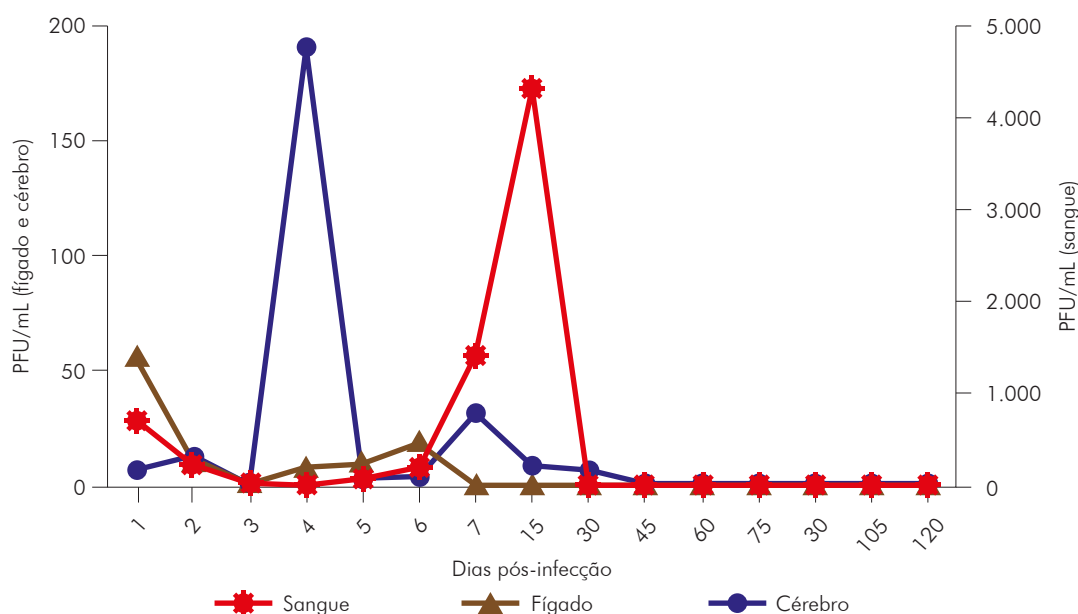
-: negativo; +: 25% do campo; ++: 50% do campo; +++: 75% do campo; n.i.: não inoculada.



**Figura 2** – Curva de dissociação: temperatura do amplicon correspondente ao VILH



**Figura 3** – Curva padrão do VILH



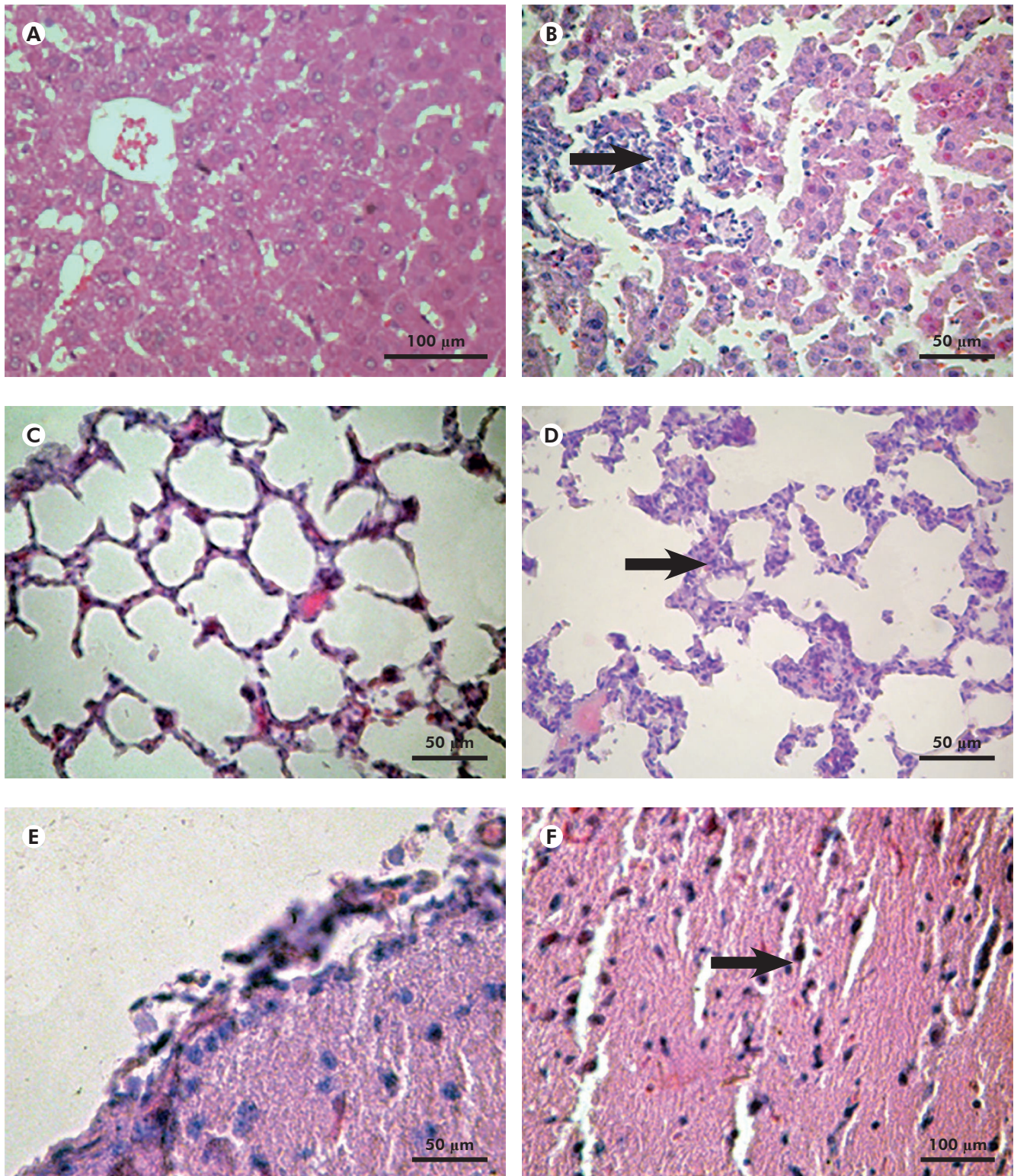
**Figura 4** – Carga viral do VILH no fígado, cérebro e sangue de hamsters em PFU/mL

As amostras de fígado coletadas durante a cinética do VILH apresentaram detecção do genoma viral a partir do primeiro d.p.i., sendo nesse dia detectado o título máximo. Após o segundo d.p.i. até o sexto d.p.i., não houve muita alteração na quantificação viral, que desapareceu após o sétimo d.p.i. Nas amostras de cérebro coletadas dos animais infectados com o VILH, foi observada carga viral a partir do primeiro d.p.i., sendo o título máximo detectado no quarto d.p.i.; a partir do quinto d.p.i., a carga viral detectada diminuiu e permaneceu sem muitas alterações até 30 d.p.i. A viremia no sangue foi detectada por qRT-PCR a partir do primeiro d.p.i. em hamsters, e a carga viral máxima foi observada no segundo d.p.i. e, após esse evento, houve uma diminuição no título viral, permanecendo com pouca alteração até 15 d.p.i. (Figura 4).

Na infecção pelo VILH em *Mesocricetus auratus*, as lesões teciduais foram mais evidentes no fígado, pulmão, rim e cérebro, embora tenham sido observadas pequenas alterações no coração e baço, caracterizadas

por edema acompanhado por infiltrado mononuclear entre os espaços que permeiam os miocardiócitos; e hiperplasia do baço, dando um aspecto reacional.

As seções histológicas de fígado (Figura 5B) inoculado com o VILH mostraram tumefação celular e frequentes hepatócitos necrosados ou apoptóticos, com espaços porta, mostrando moderado infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, não se observando alterações de veia, artéria e canaliculo biliar. Não houve evidências de colestase e, tampouco, predileção por área específica de Rapaport. Além disso, o ácino mostrou hipertrofia de células de Kupffer. Alterações regenerativas foram observadas a partir do sexto d.p.i. e se estenderam até o 30° d.p.i., e foram, principalmente, representadas por regeneração do tipo dupla placa. As alterações observadas no parênquima hepático sofreram considerável diminuição após o 15° d.p.i. e atenuaram-se consideravelmente até o 30° d.p.i., inclusive em algumas áreas desapareceu completamente.

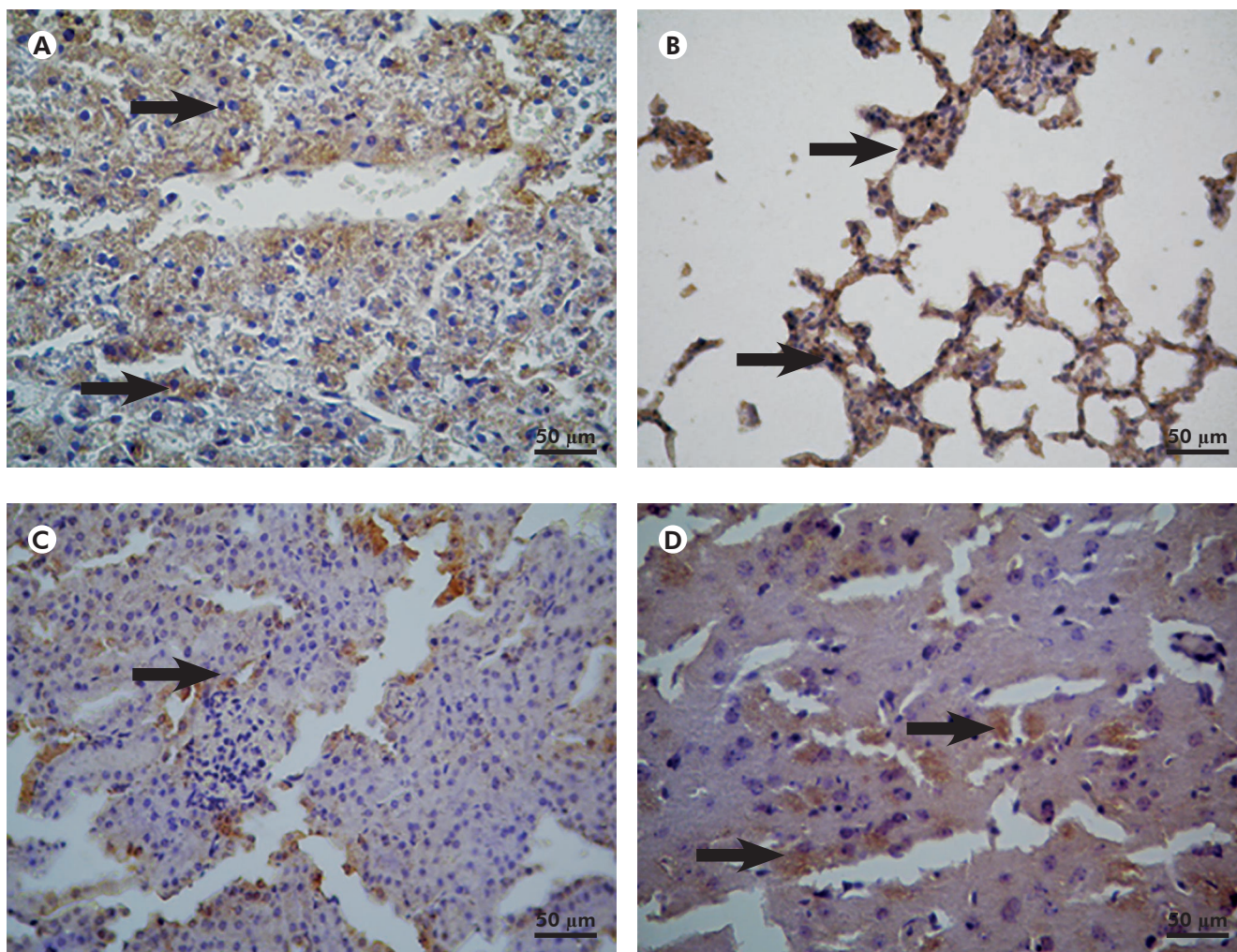


**A:** Fígado de animal controle; **B:** Fígado de animal infectado, apresentando infiltrado mononuclear evidente em meio ao qual se observa ácido hepático com hepatócitos balonizados (tumefeito) e capilares sinusoides com presença de congestão (seta), 15 d.p.i.; **C:** Pulmão de animal controle; **D:** Tecido pulmonar com espessamento das paredes alveolares devido à congestão, ao edema e infiltrado mononuclear (seta), 15 d.p.i.; **E:** Sistema nervoso central (SNC) apresentando meninge com infiltrado inflamatório mononuclear e edema, 15 d.p.i.; **F:** SNC apresentando gliose reativa e edema (seta), 15 d.p.i.

**Figura 5** – Micrografia por HE de hamsters infectados com o VILH

O fígado dos hamsters infectados pelo VILH demonstrou presença de antígeno viral (Figura 6A) revelado pela imuno-histoquímica e foi intensa no período do primeiro ao 15º d.p.i., com pico no sétimo dia, decaindo a partir daí até o 30º d.p.i., com desaparecimento quase que completo do antígeno viral no 30º d.p.i.

No pulmão inoculado com o VILH, foi observada congestão de tabiques alveolares e espessamento dos mesmos à custa de edema, congestão e infiltrado mononuclear, com áreas de franca pneumonite e focos de necrose discreta (Figura 5D). Esse quadro teve seu pico entre o quinto e sexto d.p.i., mantendo-se até cerca de 15 d.p.i., melhorando substancialmente entre 15 e 30 d.p.i.



A: Hepáticos, quatro d.p.i.; B: Pulmonar, 30 d.p.i.; C: Renal, quatro d.p.i.; D: Nervoso, quatro d.p.i.

**Figura 6** – Fotomicrografia da análise imuno-histoquímica de órgãos de hamsters dourados infectados com o VILH, mostrando resultado positivo por meio da marcação acastanhada (seta) nos tecidos

O antígeno viral foi identificado no parênquima pulmonar dos animais infectados pelos VILH (Figura 6B), teve quantitativamente o mesmo comportamento observado no fígado, com presença de maior intensidade de imunomarcagem até 15 d.p.i., decaindo daí em diante e praticamente desaparecendo com 30 d.p.i.

No rim dos animais infectados pelo VILH, observou-se congestão glomerular associada à edema e focos de necrose tubular e este relacionado a leve infiltrado de linfócitos e plasmócitos que se distribuíam principalmente no interstício do parênquima renal. As alterações tiveram pico no sexto d.p.i. e mantiveram-se até o 15º d.p.i., melhorando a partir daí e se mantendo discretas até o 30º d.p.i.

No rim, a imunomarcagem para antígenos virais do VILH (Figura 6C) mostrou positividade franca do parênquima, com pico no sétimo d.p.i.; essa imunomarcagem manteve-se em intensidade até o 15º d.p.i., a partir de então decaiu de intensidade e desapareceu quase por completo no 30º d.p.i.

No cérebro dos hamsters infectados pelo VILH, foram observados congestão e infiltrado mononuclear ao nível das meninges associados à edema intraparenquimatoso, que se caracteriza pela presença

de vacuolização ao redor dos corpos neuronais e gliose cerebral (Figuras 5E e 5F). Essas alterações sofreram seu pico máximo entre o quarto e sexto d.p.i., e mantiveram-se até o 15º d.p.i., atenuando entre o 16º e 30º d.p.i. Ressalta-se que alterações mínimas foram observadas no 30º d.p.i.

A marcação de imuno-histoquímica para o antígeno viral no SNC dos hamsters infectados pelo VILH mostrou positividade no parênquima cerebral (Figura 6D) e a intensidade de antígenos foi mais proeminente entre o primeiro e sexto d.p.i., persistindo em níveis baixos do 15º d.p.i. em diante.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os hamsters jovens são bons modelos experimentais para a infecção pelo VILH e, que além de infecção aguda, demonstram suscetibilidade para infecção persistente.

Os hamsters infectados com o VILH desenvolveram viremia por três d.p.i., detectados nos sobrenadantes de cultivo de células infectadas com sangue pela técnica de IFI. Anticorpos IH foram identificados no soro dos animais infectados a partir do quinto d.p.i., que coincidiu com o desaparecimento de vírus no sangue. Esse evento também foi observado por Tesh

et al<sup>10</sup> em um estudo sobre infecção persistente pelo VWN em hamsters, que igualmente não detectaram viremia nesses animais após o aparecimento de anticorpos IH. Isso provavelmente se deve à presença dos anticorpos neutralizantes que se fixam ao vírus, formando imunocomplexos, não permitindo a entrada do mesmo em novas células, evitando a replicação viral, que em seguida são eliminadas do organismo pelos mecanismos de defesa imune.

Embora todos os sobrenadantes de células infectados com órgãos, sangue, soro e urina tenham mostrado a presença de partículas virais viáveis, mediante o isolamento, confirmando a infecção e a replicação viral, por meio da positividade dos testes de IFI, não foi observada persistência viral nas células VERO por essa técnica. Ressalta-se, entretanto, que a cultura direta dos órgãos infectados provavelmente não foi a melhor estratégia para observar persistência viral. Essa evidência também foi detectada por Xiao et al<sup>19</sup> e Siirin et al<sup>8</sup> em estudos com VWN e VESL, respectivamente, pois é sabido que, no momento da maceração dos fragmentos de órgãos, ocorre liberação de vírus intracelular, os quais podem entrar em contato com anticorpos presentes no sangue e fluidos intersticiais dos tecidos, reduzindo, dessa forma, a sensibilidade desse método de estudo para demonstração de persistência viral. Esses autores sugerem que a técnica de cocultivo é a mais apropriada para demonstração de persistência viral por flavivírus, pois a lavagem do tecido com tripsina-EDTA, que ocorre durante o preparo do espécime, presumidamente, elimina muitos ou todos os anticorpos neutralizantes, sem destruir o vírus intracelular, o qual seria subsequentemente liberado e amplificado no cocultivo com a monocamada de célula VERO<sup>9</sup>.

A urina tem mostrado ser um bom espécime clínico para isolar flavivírus e também para demonstrar a persistência viral em cultura direta de células VERO<sup>8,9,10</sup>. Neste experimento, conseguiu-se isolar o vírus a partir da urina, o que mostra que a urina dos animais contaminados é infecciosa. Ressalta-se, no entanto, que, nos estudos nos quais foi demonstrada uma boa resposta de isolamento do vírus, a urina foi diluída em PBS antes da inoculação em célula VERO. Neste estudo, a urina foi inoculada diretamente em uma proporção final de 1:50 em células VERO, sendo que sua toxicidade pode ter influenciado nos resultados obtidos. No teste de qRT-PCR, foi possível detectar vírus na urina, mesmo em concentração muito pequena. Foram selecionadas as três últimas amostras possíveis de serem coletadas durante a cinética experimental com o VILH (15, 30 e 75 d.p.i.), obtendo resultado positivo para 30 d.p.i., com título de 0,9 PFU/mL (dados não mostrados).

Nas amostras testadas pela técnica de qRT-PCR (sangue, fígado e cérebro), apenas o cérebro apresentou persistência viral. Apesar da qRT-PCR ser mais sensível, quando comparada com os resultados obtidos por IFI que detectou antígenos virais por, no

máximo, 15 d.p.i. nas amostras de sobrenadantes de células infectadas do cérebro coletadas durante a cinética (Tabela 1), não foi possível observar persistência viral por qRT-PCR por mais de 30 d.p.i. no cérebro, bem como persistência viral no sangue e fígado dos hamsters infectados com VILH.

O título extremamente elevado de anticorpos IH, observado durante o experimento, com o pico máximo (1:12.800) no 15 d.p.i., possivelmente explica a eliminação total do VILH após 30 d.p.i., inclusive por qRT-PCR. Um dado que fortalece essa relação é o estudo de persistência viral por vírus Rocio (VROC), no qual foi utilizado o mesmo desenho experimental que demonstrou anticorpos IH com título máximo 10 vezes menor que o observado neste estudo, sendo possível detectar o VROC por três meses no cérebro, fígado e sangue por qRT-PCR<sup>20</sup>.

O VILH foi capaz de produzir em hamsters alterações patológicas e expressão de antígenos virais nas amostras de fígado, rim, pulmão e cérebro, coletados durante a cinética por até quatro meses. Observou-se que o VILH promoveu infecções pantrópicas de caráter inflamatório, causando lesões histológicas no SNC, fígado, rim, baço, pulmão e coração. A intensidade e amplitude das lesões teciduais variaram entre os diferentes órgãos acometidos, sendo observado que as lesões foram mais evidentes no SNC; seguido pelo fígado, as quais também foram evidenciadas pelos ensaios de IHQ e qRT-PCR. Essas observações corroboram o estudo sobre patogenicidade do VILH em hamster jovens, realizado por Azevedo<sup>21</sup>.

As lesões intensas no SNC, seja no parênquima cerebral, com lesões neuronais, ou na meninge, resultando em meningite com infiltrado inflamatório persistindo por quatro meses, evidenciaram novamente o neurotropismo e a capacidade do VILH de causar encefalite nos hamsters. Alguns autores consideram que o que poderia facilitar a persistência do vírus no cérebro seria a infecção neuronal. Neurônios maduros são mais resistentes à indução de apoptose e, possivelmente, essa resistência seria mediada pela expressão neuronal de inibidores de apoptose, como bcl-2, bcl-x e mcl-1, que poderia ser considerada um mecanismo de preservação dessa não renovável população de células. Essas células são deficientes em constituintes celulares necessários para apresentar antígenos que serão reconhecidos pelas células T citotóxicas, ou seja, são deficientes na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I<sup>22</sup>.

O fato de alguns resultados nos ensaios de IHQ terem apresentado positividade por mais tempo quando comparados à técnica de qRT-PCR (amostras de fígado e cérebro infectados pelo VILH), pode estar relacionado à qRT-PCR detectar somente o genoma do vírus, enquanto a IHQ detecta qualquer proteína viral, podendo ter ocorrido, de alguma forma, degradação do RNA, resultando em qRT-PCR negativo, mas permanecendo proteínas virais detectáveis por IHQ.

Ressalta-se que alguns vírus recuperados de cérebro de animais têm sofrido atenuação da neurovirulência, indicando a seleção para variantes genéticas e/ou partículas virais defeituosas, que podem inibir a produção de vírus infeccioso<sup>23</sup>.

Em fragmentos de baço e coração inoculados com o VILH, apesar de se ter observado replicação viral dos mesmos em células VERO e a ocorrência de alterações teciduais, não se conseguiu demonstrar a presença de antígenos virais por IHQ. Isso pode sugerir que a replicação viral em células VERO, assim como as lesões teciduais encontradas podem ser decorrentes da passagem do vírus por esses órgãos por meio do sangue, e que seria necessário a técnica de cocultivo de células VERO para demonstrar a infecção viral persistente, ou ainda a utilização da técnica de qRT-PCR, como demonstrado para o cérebro.

O estudo histopatológico apresentou alterações de caráter inflamatório no rim para o vírus em estudo. Esse resultado aliado à detecção de antígenos virais no rim e RNA viral por qRT-PCR na urina, por no

mínimo 30 d.p.i., em hamsters, sugerem o rim como um órgão envolvido na resistência da infecção por flavivírus, corroborando os achados de Siirin et al<sup>8</sup> que observaram, nesses mesmos animais em estudo de infecção persistente por VESL, a ocorrência de alterações nos tecidos renais e infecção pelo VESL na urina por um prolongado período.

## CONCLUSÃO

Os resultados com o VILH, juntamente com os obtidos em outros estudos, sugerem que infecções persistentes podem ocorrer com uma variedade de flavivírus em vertebrados e que a persistência desses não é um fenômeno tão incomum. Entretanto, são necessários estudos adicionais para determinar como exatamente a infecção persistente pelo flavivírus VILH se estabelece, incluindo a via de introdução no SNC, as células que possibilitam a infecção no SNC, os grupos celulares envolvidos na expressão da infecção e na resposta imune protetora, dentre muitos outros aspectos da patogenia.



## REFERÊNCIAS

- 1 Vasconcelos PFC, Azevedo RSS, Rodrigues SG, Martins LC, Chiang JO, Travassos da Rosa APA. Arboviroses In: Leão RNQ, organizador. Medicina tropical e infectologia na Amazônia. Belém: Samauma; 2013. p. 481-503.
- 2 Karabatsos N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrate. 3rd ed. San Antonio: ASTMH; 1985. 1141 p.
- 3 Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol. 1989 Jan;70(Pt 1): 37-43.
- 4 Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC. Arboviroses. In: Leão RNQ, coordenador. Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico. Belém: Cejup, UEPA, IEC; 1997. p. 207-26.
- 5 Cruz ACR, Travassos da Rosa APA, Ferreira II, Albuquerque MMM, Galler R. Ilheus virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) is closely related to Japanese encephalitis virus complex. Intervirology. 1997;40(4): 220-5.
- 6 Pereira EL, Suzuki A, Coimbra MLT, Souza PR, Chamelet BL. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulea* e *Molothrus bonariensis*). Rev Saude Publica. 2001 abr;35(2):119-23.
- 7 Oldstone MBA. Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. Virology. 2006 Jan;344(1):111-8.
- 8 Siirin MT, Duan T, Lei H, Guzman H, Travassos da Rosa APA, Watts DM, et al. Chronic St. Louis encephalitis virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Am J Trop Med Hyg. 2007 Feb;76(2): 299-306.
- 9 Tony JH, Xiao SY, Siirin M, Chen H, Travassos da Rosa APA, Tesh RB. Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. Am J Trop Med Hyg. 2005 Mar;72(3):320-4.
- 10 Tesh RB, Siirin M, Guzman H, Travassos da Rosa APA, Wu X, Duan T, et al. Persistent West Nile virus infection in the golden hamster: studies on its mechanism and possible implications for other flavivirus infections. J Infect Dis. 2005 Jul;192(2):287-95.
- 11 Clark DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. Am J Trop Med Hyg. 1958 Sep;7(5):561-73.
- 12 Shope RE. The use of a micro hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. An Microbiol. 1963 Sep;11(Pt A): 167-9.
- 13 Beaty BJ, Calisher CH, Shope RE. Arboviruses. In: Schmidt NJ, Emmons EW, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Washington: American Public Health Association; 1989. p. 797-855.
- 14 Lennette DA. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7th ed. Washington: American Public Health Association; 1995. p. 3-25.

- 15 Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg.* 1979 Nov;28(6):1053-9.
- 16 Kuno G. A manual of cell culture techniques for small arbovirus diagnostic laboratories. Fort Collins: CDC; 1998.
- 17 Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory methods in histotechnology. Washington: American Registry of Pathology; 1992. p. 3-80.
- 18 Carvalho VL, Nunes MRT, Silva EVP, Vieira CMA, Gomes M, Casseb SM, et al. Genetic characterization of orthobunyavirus Melao, strains BE AR633512 and BE AR8033, and experimental infection in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Gen Virol.* 2009 Jan;90(Pt 1):223-33.
- 19 Xiao SY, Zhang H, Guzman H, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *J Infect Dis.* 2001 May;183(10):1437-44.
- 20 Henriques DF, Quaresma JAS, Fuzii HT, Nunes MRT, Silva EVP, Carvalho VL, et al. Persistence of experimental Rocio virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Aug;107(5):630-36.
- 21 Azevedo RSS. Estudo experimental sobre a patogenicidade do vírus Ilhéus em hamsters jovens (*Mesocricetus auratus*) [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2004.
- 22 Griffin DE. Arboviruses and the central nervous system. *Springer Semin Immunopathol.* 1995 Sep;17(2): 121-32.
- 23 Chambers TJ, Monath TP, editors. The flaviviruses: pathogenesis and immunity. Vol. 60. California: Elsevier; 2003. p. 3-17.

Recebido em / Received: 5/7/2016  
Aceito em / Accepted: 16/9/2016