

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Tese de Doutorado

**ANÁLISE DE VIAS SINALIZADORAS CELULARES
COMO POTENCIAIS ALVOS ANTIVIRAIS: PAPEL
EXERCIDO NO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS
DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS (SLEV)**

Mara Camila Arantes Marques de Aguiar

Belo Horizonte
2017

Mara Camila Arantes Marques de Aguiar

**ANÁLISE DE VIAS SINALIZADORAS CELULARES COMO
POTENCIAIS ALVOS ANTIVIRAIS: PAPEL EXERCIDO NO
CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS DA ENCEFALITE DE
SAINT LOUIS (SLEV)**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte, Março de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Os Flavivírus	1
1.1.1 Aspectos Gerais	1
1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)	2
1.2.1 Histórico e epidemiologia	2
1.2.2 Manifestações clínicas e prevenção	5
1.2.3 Filogenia e Virulência	6
1.3 Aspectos gerais da biologia dos Flavivírus	9
1.3.1 Estrutura e genoma viral	9
1.3.2 Proteínas virais	11
1.3.3 Ciclo de multiplicação viral	14
1.3.4 Interações vírus-hospedeiro	16
1.4 Proteínas cinases	19
1.4.1 Família Src de tirosina cinases (SFKs)	20
1.4.2 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)	25
1.4.3 SFKs e MAPKs – importância no ciclo de multiplicação viral	28
1.4.4 Inibidores Farmacológicos de SFKs e MAPKs	31
1.5 Modelos animais para SLEV	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40

4.1	Linhagens celulares	40
4.1.1	Células C6/36	40
4.1.2	Células BHK-21	40
4.2	Vírus	40
4.2.1	DENV-3.....	40
4.2.2	SLEV	41
4.2.3	Titulação viral	41
4.3	Inibidores Farmacológicos e Anticorpos	42
4.4	Teste da viabilidade celular	42
4.5	Ensaio Virucida	43
4.6	Ensaio Dose-Resposta	43
4.7	Curva de Multiplicação Viral	44
4.8	Extração de Proteínas Totais	44
4.9	Transferência de Western	45
4.10	Microscopia Eletrônica de Transmissão	46
4.11	Avaliação do potencial efeito antiviral dos IFs em modelo animal	47
4.11.1	Modelo animal e delineamento experimental	47
4.11.2	Estudo da Dose-Letal (DL50)	49
4.11.3	Ensaio de Tolerabilidade	50
4.11.4	Quantificação viral após o tratamento com os inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1)	50
4.11.5	Extração do RNA total do cérebro e baço e transcrição reversa	51
4.11.6	PCR quantitativa em tempo Real (RT-qPCR)..	52
4.11.7	Curva de sobrevivência frente ao tratamento com os inibidores de Src (IF-Src-1) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1)	53
4.11.8	Teste SHIRPA	53
4.11.9	Histologia órgãos	54
5. RESULTADOS		55
5.1	Viabilidade celular após o tratamento com os inibidores farmacológicos (IFs)	55
5.2	Ensaio Virucida	57

5.3	Análise da potencial atividade antiviral dos inibidores de Src/Abl frente à infecção com o SLEV	58
5.3.1	Curva Dose-Resposta dos títulos de SLEV frente ao tratamento com os inibidores de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2) e do inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2)	58
5.3.2	Curva de Multiplicação do SLEV frente ao tratamento com os inibidores de Src/Abl	61
5.4	Análise da potencial atividade antiviral dos inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 frente à infecção com o DENV-3.....	64
5.5	Cinética de fosforilação de Src e de MEK/ERK após a infecção de células BHK-21 com o SLEV	65
5.6	Cinética de inibição da fosforilação de Src após o tratamento de células BHK-21 com os inibidores de Src/Abl.....	66
5.7	Inibição da fosforilação via de sinalização de MEK/ERK após o tratamento de células BHK-21 com os inibidores de MEK1/2 (IF-MEK/ERK-1) e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2).....	66
5.8	Análise cinética do efeito dos inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-2) no ciclo de multiplicação do SLEV	70
5.9	Microscopia Eletrônica de Transmissão	73
5.10	Avaliação do potencial efeito antiviral dos IFs em modelo animal	80
5.10.1	Confirmação do genoma viral no cérebro após a infecção intraperitoneal com o SLEV	80
5.10.2	Estudo da Dose-Letal 50 (DL50)	82
5.10.3	Tolerabilidade dos camundongos aos IFs IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK/ERK-1.....	84
5.10.4	PCR quantitativa em tempo Real (RT-qPCR) do cérebro e baço dos animais infectados e tratados com os IFs IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK/ERK-1 .85	
5.10.5	Curva de sobrevivência dos camundongos tratados com os IFs IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1 após a infecção com o SLEV.....	86
5.10.6	Teste SHIRPA	88
5.10.7	Histologia dos órgãos	90
6.	DISCUSSÃO	94

7. CONCLUSÕES/PERSPECTIVAS	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9. ANEXO	121

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Casos de doença e mortes provocadas pelo SLEV relatadas ao CDC, por ano e avaliação clínica, de 2004 2013.....	3
Tabela 2: Esquema de classificação do SLEV.....	7
Tabela 3: Delineamento experimentos “in vivo”.....	46
Tabela 4: Iniciadores Utilizados.....	51
Tabela 5: Teste SHIRPA.....	52
Tabela 6: Estudo da DL50.....	82
Figura 1: Doenças associadas ao SLEV nos EUA entre 1964 a 2010.....	3
Figura 2: Estrutura esquemática dos vírus da família <i>Flaviviridae</i>	9
Figura 3: Organização do genoma e funções das proteínas virais.....	10
Figura 4: Diagrama esquemático do processamento da poliproteína precursora dos Flavivírus e formação das proteínas virais.....	13
Figura 5: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos Flavivírus.....	15
Figura 6: Organização dos domínios das principais subfamílias das NRTKs..	21
Figura 7: Organização dos cinco domínios funcionais das SFKs.....	22
Figura 8: Modelo esquemático ativação de c-Src.....	24
Figura 9: Módulo de fosforilação da serina-treonina-MAP-quinase ativado por Ras.....	25
Figura 10: Fluxograma dos módulos de MAPK (ERKs, JNKs e P38).....	27
Figura 11: Estrutura esquemática do sitio de ligação de ATP de uma proteína quinase.....	32
Figura 12: Ensaio de viabilidade celular.....	55
Figura 13: Ensaio virucida realizado com o SLEV e os inibidores de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2).....	56

Figura 14: Curva Dose-Resposta dos títulos de SLEV frente ao tratamento com os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 (Src).....	58
Figura 15: Curva Dose-Resposta dos títulos de SLEV frente ao tratamento com os inibidores IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2 (MEK/ERK).....	59
Figura 16: Curva de Multiplicação do SLEV frente ao tratamento com o inibidor IF-Src-1 (Src).....	61
Figura 17: Curva de Multiplicação do SLEV frente ao tratamento com o inibidor IF-Src-2 (Src/Abl).....	62
Figura 18: Análise da ação antiviral dos inibidores de Src/Abl frente ao DENV-3.....	63
Figura 19: Cinética de fosforilação de Src e de ERK1/2 em células BHK-21 infectadas com o SLEV.....	65
Figura 20: Inibição da fosforilação de Src após o tratamento com inibidores de Src/Abl.....	67
Figura 21: Inibição da fosforilação de ERK1/2 após o tratamento com diferentes concentrações do inibidor IF-MEK/ERK-1.....	68
Figura 22: Inibição da fosforilação de ERK1/2 após o tratamento com inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 de Src/Abl.....	68
Figura 23: Análise cinética do efeito do inibidor de Src (IF-Src-1 10 μ M) no ciclo de multiplicação do SLEV (M.O.I.=1,0).....	69
Figura 24: Análise cinética do efeito dos inibidores de Src (IF-Src-1 10 μ M e IF-Src-2 2.5 μ M) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 15 μ M) no ciclo de multiplicação do SLEV (M.O.I.=0,01).....	70
Figura 25: Micrografia eletrônica de transmissão mostrando (A e B) células BHK-21 não-infectadas.....	72
Figura 26: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com DMSO.....	74
Figura 27: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de Src (IF-Src-1).....	75
Figura 28: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de Src (IF-Src-2).....	76

Figura 29: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1).....	77
Figura 30: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-2).....	78
Figura 31: Quantificação de vírions, complexos de replicação e vesículas vazias.).....	79
Figura 32: RT-PCR do cérebro de camundongos infectados com o SLEV por via intracraniana (i.c.) e intraperitoneal (i.p.).	80
Figura 33: Titulação viral do SLEV a partir de órgãos de camundongos infectados com o SLEV.....	81
Figura 34: Curva de Sobrevivência (A) e curva de peso (B) para determinação da DL50.....	82
Figura 35: Curva de peso animais tratados com os IFs.....	84
Figura 36: Análise de RT-qPCR do cérebro e baço de animais tratados com os IFs.....	84
Figura 37: Curva de Sobrevivência (A) e curva de peso (B) animais tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1).....	86
Figura 38: Teste SHIRPA em animais tratados com os IFs de Src e MEK/ERK.....	88
Figura 39: Intestino de camundongos infectados tratados com os IFs.....	89
Figura 40: Histologia do cérebro e intestino dos animais infectados.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Trifosfato de adenosina
BBB- *Blood Brain Barrier*
BHE - Barreira hematoencefálica
BSA - albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
cDNA – DNA complementar
CEUA - pela Comissão de Ética no Uso de Animais
CLRs - Receptores de lectina tipo C
CO₂ – Dióxido de carbono
CTL - Linfócitos T citotóxicos
CSF-1 – Fator estimulador de colônia 1
Csk - Cinase C-terminal
DC-SIGN - *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina)
DENV - *Dengue virus*
DL50 – Dose leta 50
DMEM – Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dsRNA - RNA fita dupla
DTT - ditioneitol
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
EGF - fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth factor*)
EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular
FAK - Cinase de adesão focal
FDA - US Food and Drug Administration
FGF - fator de crescimento de fibroblastos (*Fibroblast growth factors*)
GAPDH - Gliceroldeído 3-fosfato desidrogenase
GTP – Trifosfato de guanosina
GTS – Grupo de transdução de sinal

HCV – *Hepatitis C virus*
hpi – Horas pós-infecção
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IFs – Inibidores Farmacológicos
IFN – Interferon
IL – Interleucina
JEV - *Japanese encephalitis virus*
Jaks - Janus cinases
JNK – Cinase do N-terminal de c-Jun
kDa - Quilodalton
Kb - Quilopares de bases nucleotídicas
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
MEK – Cinase da MAPK ERK
MHC-I - Complexo principal de histocompatibilidade I
ncRNA - RNA não codificante
NFκB – Fator nuclear κB
NGF - fator de crescimento nervoso (*Nerve growth factor*)
NK - Células *natural killers*
μg – Micrograma
μL – Microlitro
μM – Micromolar
mL – Mililitro
mM - Milimolar
nm – Nanômetro
M.O.I – Multiplicidade de infecção
mRNA – RNA mensageiro
NRTKs - *Nonreceptor tyrosine kinases* (Tirosinas cinases não receptoras)
ONF - *Oligonucleotide fingerprinting*
ORF – *Open reading frame* (Janela aberta de leitura)
PBS – Solução tamponada de fosfato
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase
PRRs - Receptores de Reconhecimento de Patógenos
PTKs - *Protein tyrosine kinases* (Proteínas tirosinas cinases)

RE – Retículo Endoplasmático

RIG-1 – Gene induzível por ácido retinóico - 1

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotação por minuto

RpRd – RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*)

RT-PCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

RT-qPCR – PCR quantitativa em tempo Real (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR)

RTKs – *Receptor tyrosine kinases* (Tirosinas cinases receptoras)

SFB - Soro Fetal Bovino

SHIRPA - SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment

STAT-1 – Transdutor de sinais e ativador de transcrição 1

SFKs - Família Src de tirosina cinases

sfRNA - RNA subgenômico

SLEV - *Saint Louis encephalitis virus*

SNC - Sistema nervoso central

TBEV - *Tick-born encephalitis vírus*

TBS - Tampão Salina Tris

TLR3 – Receptores do tipo Toll 3

TNF – Fator de necrose tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

U.F.P - Unidades formadoras de placa

UTR - *Untranslated region* (Região terminal não codificadora)

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

VP – Pacotes de vesículas

YFV - *Yellow fever virus*

WNV - *West Nile virus*

RESUMO

A Encefalite Viral de Saint Louis é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo *Vírus da Encefalite de Saint Louis (Saint Louis Encephalitis virus - SLEV)*, membro do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*). A infecção humana com o SLEV geralmente resulta em uma doença assintomática, apresentando resolução espontânea, mas entre os pacientes que desenvolvem síndrome no sistema nervoso central (SNC), a encefalite é mais comum, seguido de meningite asséptica e dor de cabeça febril. A doença é endêmica nos Estados Unidos, mas casos também ocorrem na América do Sul e Central, com menor frequência. Assim como para outros Flavivirus, ainda não existe um tratamento que seja eficaz contra o SLEV. Estudos recentes, realizados pelo Grupo de Transdução de Sinal/LabVirus/ICB/UFMG, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, demonstraram a potencial ação anti-poxviral, anti-YFV e anti-DENV de alguns inibidores, particularmente das vias sinalizadoras celulares envolvendo as MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) e, especificamente, MEK/ERK. Estas vias participam da regulação de virtualmente todos os processos celulares, podendo ser requeridas pelos vírus durante seus ciclos de multiplicação. O objetivo deste estudo foi investigar a possível ação antiviral contra o SLEV de inibidores farmacológicos que afetam MEK/ERK e de tirosinas cinases da família de Src/Abl tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Foi possível verificar que o tratamento de células BHK-21 com os IFs de Src e de MEK/ERK promovem uma redução significativa no título viral do SLEV (= ou > 1 log) e estes inibidores atuam em etapas distintas da multiplicação viral. Contudo nos testes *in vivo*, nenhum dos IFs (Src e de MEK/ERK) foi capaz de promover a proteção dos animais ou de reduzir significativamente a carga viral após a infecção com o SLEV. Possivelmente, a ineficácia destes inibidores pode estar relacionada ao neurotropismo do SLEV, uma vez que, o tratamento com um dos IFs de MEK/ERK, que exibe ação antiviral contra o DENV *in vivo*, também não apresentou eficácia contra o SLEV. Portanto, torna-se necessário avaliar também se os IFs são capazes de cruzar a BHE em concentrações satisfatórias para exercer a atividade antiviral contra SLEV, observada *in vitro*.

ABSTRACT

Saint Louis Viral Encephalitis is an acute febrile infectious disease caused by *Saint Louis Encephalitis virus* (SLEV), a member of the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae* family). Human infection with SLEV virus usually results in an asymptomatic disease presenting spontaneous resolution, but among patients developing central nervous system (CNS) syndrome, encephalitis is more common, followed by aseptic meningitis and febrile headache. The disease is endemic in the United States, but cases also occur, less frequently, in South and Central America. Likewise other *Flavivirus* infections, there is still no effective treatment against SLEV. Recent studies conducted by the Signal Transduction Group / LabVirus / ICB / UFMG, both *in vitro* and *in vivo*, have demonstrated the potential anti-poxviral, anti-YFV and anti-DENV action of some inhibitors, particularly the cellular signal pathways involving the MAPKs (mitogen-activated protein kinases) and, specifically, MEK / ERK. These pathways participate in the regulation of virtually all cellular processes and may be required by viruses during their multiplication cycles. The aim of this study was to investigate the possible antiviral action against SLEV of pharmacological inhibitors that affect MEK / ERK and Src / Abl family tyrosine kinases both *in vitro* and *in vivo*. It was found that treatment of BHK-21 cells with Src and MEK / ERK IFs promoted a significant reduction in the SLEV viral titre ($=$ or > 1 log) and these inhibitors act at distinct steps of viral multiplication. However, in the *in vivo* tests, none of the IFs (Src and MEK / ERK) was able to promote the protection of the animals or to reduce significantly the viral load after infection with the SLEV. Possibly, the ineffectiveness of these inhibitors may be related to SLEV neurotrophism, since treatment with one of the MEK/ERK IFs, which exhibits antiviral action against DENV *in vivo*, also failed to show efficacy against SLEV. Therefore, it is also necessary to evaluate whether the IFs are able to cross the BBB in satisfactory concentrations to exert the antiviral activity against SLEV, observed *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Flavivírus

1.1.1 Aspectos Gerais

Os arbovírus (do inglês *arthropod-born viruses*) incluem vírus de diferentes famílias (*Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*), mantidos na natureza através de ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos) que, após a infecção, transmitem estes micro-organismos a hospedeiros vertebrados (principalmente aves e mamíferos) (FIGUEIREDO, 2007). Dentre os arbovírus, o gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (do latim *Flavus* ou “amarelo” em referência ao Vírus da Febre Amarela), protótipo da família, se encontra amplamente distribuído por todo o mundo, com exceção da Antártida, e possui cerca de 53 espécies (ICTV, 2016), sendo que muitas delas estão associadas a doenças humanas. Vários vírus de grande importância em saúde pública estão incluídos nesse gênero, como os vírus da Dengue (*Dengue virus* - DENV), da Febre Amarela (*Yellow fever virus* - YFV), da Encefalite de Saint Louis (*Saint Louis encephalitis virus* - SLEV), da Encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus* - JEV), do Oeste do Nilo (*West Nile virus* - WNV), vírus da encefalite transmitida por carrapato (*tick-born encephalitis virus* - TBEV), entre outros (FIGUEIREDO, 2007).

Os Flavivírus podem ser organizados em complexos e sub-complexos antigênicos baseados em critérios sorológicos, ou em grupos, clados e espécies baseados em sua filogenética molecular (LINDENBACH *et al*, 2007). Eles podem ser agrupados em relação ao tipo de vetor transmissor, sendo que 27 são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 não possuem vetor conhecido. Os vírus transmitidos por mosquitos podem ser divididos ainda em dois grandes grupos, comumente baseados no vetor principal, *Aedes spp.* ou *Culex spp.*, e nas manifestações clínicas em humanos. Os vírus transmitidos por mosquitos do gênero *Culex* inclui o sorogrupo do JEV, que geralmente

causam encefalite e possuem as aves como reservatórios naturais, enquanto que o grupo de vírus transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, incluem o DENV e o YFV e o Zika, que são viscerotrópicos/neurotrópicos e possuem primatas como reservatório natural (GAUNT *et al*, 2001). O sorogrupo do JEV agrupa alguns Flavivírus de grande importância médica nas Américas, como o SLEV, WNV e o vírus Rocio, este sorogrupo apresenta alta taxa de reações antigênicas cruzadas entre os membros da família, o que dificulta o diagnóstico destas infecções (CHAMBERS *et al*, 1990).

1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)

1.2.1 Histórico e epidemiologia

Em 1932, o vírus da Encefalite de St. Louis (*Saint Louis encephalitis virus-SLEV*) foi reconhecido pela primeira vez como um patógeno humano após um surto em Paris, Illinois, EUA (BURKE & MONATH 2001). No ano seguinte, em 1933, uma grande epidemia ocorreu em St. Louis, Missouri, EUA, onde mais de 1095 casos, com 201 mortes, foram relatados. Desde então, inúmeros casos já ocorreram, com pelo menos 41 surtos de SLEV relatados nos Estados Unidos e Sul do Canadá, cada um envolvendo vinte ou mais diagnósticos de infecção clínica em seres humanos (DAY, 2001).

O SLEV se encontra amplamente distribuído em todo o hemisfério ocidental, desde o Canadá até Argentina (FIGUEIREDO, 2007). Grande parte dos casos relatados ocorre nos EUA (figura 1 e tabela 1), com uma taxa de letalidade de 5% a 30% (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*, 2015), mas casos também ocorrem com menor frequência na América do Sul e Central (RODRIGUES *et al*, 2010). No entanto, o SLEV já causou surtos de encefalite na Argentina e no Brasil (SPINSANTI *et al*, 2003; DIAZ *et al*, 2006; ROCCO *et al*, 2005; dos SANTOS *et al*, 2006). As linhagens Sul Americanas parecem ser mais atenuadas (similarmente ao WNV) em comparação com linhagens Norte Americanas (DIAZ *et al*, 2006).

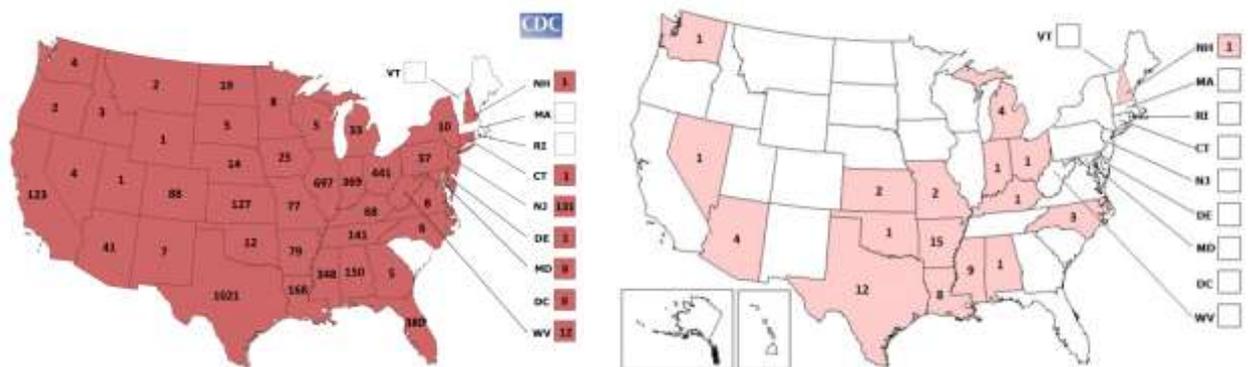


Figura 1: Doenças associadas ao SLEV nos EUA entre 1964 a 2010. Casos relatados de doenças neuroinvasivas (encefalites, meningoencefalites ou meningites) causadas pelo vírus da Encefalite de St. Louis nos EUA, de 1964 a 2010 (*Centers for Disease Control and Prevention CDC, 2017*).

Tabela 1
Casos da doença e mortes provocadas pelo SLEV reportadas ao CDC, por ano e avaliação clínica, de 2004 a 2013.

Ano	Doença Neuroinvasiva			Doença não-Neuroinvasiva			Total		
	Casos No.	Mortes No.	Mortes (%)	Casos No.	Mortes No.	Mortes (%)	Casos No.	Mortes No.	Mortes (%)
2004	12	0	(0)	3	0	(0)	15	0	(0)
2005	7	0	(0)	6	0	(0)	13	0	(0)
2006	7	1	(1)	3	0	(0)	10	1	(1)
2007	8	0	(0)	1	0	(0)	9	0	(0)
2008	8	0	(0)	5	0	(0)	13	0	(0)
2009	11	0	(0)	1	0	(0)	12	0	(0)
2010	8	1	(1)	2	0	(0)	10	1	(1)
2011	4	0	(0)	2	0	(0)	6	0	(0)
2012	1	0	(0)	2	0	(0)	3	0	(0)
2013	1	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(0)
Total	67	2	(3)	25	0	(0)	92	2	(2)

Source: ArboNET, Arboviral Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention

(Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention CDC, 2017*)

No Brasil, o SLEV foi isolado pela primeira vez em 1960, a partir de um pool de culicídeos do gênero *Sabethes belisarioi* capturados ao longo da rodovia Belém-Brasília (FIGUEIREDO, 2007). Posteriormente, este vírus foi isolado em animais e artrópodes na região amazônica e no Estado de São Paulo (FIGUEIREDO, 2000). Em seres humanos, o SLEV havia sido isolado somente a partir de dois pacientes na região Amazônica, em 1971 e 1978, que apresentaram manifestações caracterizadas por doença febril, mas sem sintomas neurológicos (PINHEIRO *et al*, 1981; MONDINI *et al*, 2007; TSAI & MITCHELL, 1986), e em 2004, em um caso febril humano com suspeita de dengue, na cidade de São Pedro (SP) (ROCCO *et al*, 2005). No entanto, em 2006, foi detectado o primeiro surto do SLEV no país, concomitante com um surto de DENV-3, em São José do Rio Preto, onde em 12 casos suspeitos de Dengue o genoma do foi SLEV detectado. Estes casos também representam o primeiro relato de manifestações hemorrágicas relacionada ao SLEV, já que alguns pacientes diagnosticados apresentaram estes sintomas e possivelmente já haviam sido infectados previamente pelo DENV (MONDINI *et al*, 2007).

Os reservatórios para o SLEV são aves selvagens, primatas não humanos, preguiças, tatus e marsupiais e os vetores principais são mosquitos das espécies *Culex declarator* e *C. coronator* (FIGUEIREDO, 2007). Estes reservatórios são suspeitos de participar da manutenção do SLEV num nível endêmico, indicando que o vírus pode estar circulando em algumas áreas e causando infecções em humanos (DÉGALLIER *et al*, 1992; TERZIAN *et al*, 2011). Apesar da detecção do vírus em animais de diversas regiões do Brasil (PAUVOLID-CORRÊA *et al*, 2010; ROSA *et al*, 2013), o número de detecções do SLEV em humanos pode estar subestimado.

O baixo número de infecções por SLEV reportadas no Brasil pode ser resultado de um diagnóstico laboratorial inadequado. O SLEV pode estar circulando no país e causando sintomas clínicos similares aos observados em outras infecções, como o DENV, não sendo reconhecida pelos profissionais de saúde, pois o país não possui um programa de vigilância contra esta infecção. Investigações epidemiológicas mais amplas em casos de doenças febris

devem ser realizadas no intuito de se conhecer a amplitude destas infecções no país. Estudos sorológicos mostraram a presença de anticorpos anti-SLEV em 5% da população das regiões Norte e Sudeste do Brasil (TERZIAN *et al*, 2011), no entanto, devido as reações cruzadas entre anticorpos de diferentes flavivírus e ao fato da população ser vacinada contra o YFV e altamente exposta ao DENV (MONDINI *et al*, 2007), estes resultados devem ser interpretados com cuidado.

1.2.2 Manifestações clínicas e prevenção

O quadro clínico da doença varia de manifestações assintomáticas a sintomas como febre contínua acima de 37,7°C; nível alterado de consciência, incluindo confusão, desorientação, delírios, letargia, entorpecimento e/ou coma; e disfunções neurológicas, incluindo convulsões, paralisia do nervo cranial, rigidez, paresia, paralisia, reflexos anormais e/ou tremores (DAY, 2001). O período de incubação estimado é de 4 a 15 dias, seguido do surgimento abrupto da doença, com febre, calafrios, dor de cabeça, tonturas, náuseas, anorexia, mialgia, mal-estar e dor de garganta ou tosse. Geralmente, esses sintomas são seguidos pelo desenvolvimento agudo e subagudo de sinais neurológicos. Os sinais e sintomas se intensificam ao longo de um período de até uma semana. Em alguns pacientes, isso resulta em resolução espontânea, enquanto que em outros, os sintomas de infecção do sistema nervoso central (SNC) se desenvolvem progressivamente. Entre pacientes que apresentam síndrome no SNC, a encefalite é mais comum, seguido de meningite asséptica e dor de cabeça febril (GUBLER *et al*, 2007).

A gravidade da doença causada pelo SLEV é geralmente baixa em crianças, mas aumenta com o avanço da idade, sendo que, a maior frequência de encefalite ocorre em pessoas com mais de 60 anos. A taxa de fatalidade é menor que 5% em indivíduos com idade entre 0 e 59 anos, e em indivíduos com idade entre 50-59, 60-69 e > 70 anos, a taxa de fatalidade varia entre 7, 15 e 23%, respectivamente (DAY, 2001). Em uma epidemia, o número de infecções assintomáticas excede o número de infecções sintomáticas,

estimando-se que a relação entre casos assintomáticos e sintomáticos varie de 16:1 a 425:1 (RODRIGUES *et al*, 2010). Portanto, o número de indivíduos infectados durante uma epidemia é sempre subestimado. Ainda não existem vacinas ou tratamento para esta doença.

1.2.3 Filogenia e Virulência

Uma extensa análise filogenética foi realizada por KRAMER & CHANDLER (2001), após o sequenciamento completo da região codificadora do envelope (E) (~1700 nucleotídeos), de 62 isolados da América do Norte e Sul. Os autores demonstraram que estes vírus formam um grupo monofilético, com a maioria dos isolados sendo agrupados geograficamente, e identificaram sete linhagens de SLEV, designadas I-VII (tabela 1). As linhagens I (IA e IB) e II (IIA-IIF) são predominantes na América do Norte, com poucos isolados na América do Sul. A linhagem IIE agrupa os vírus isolados em Parton (1933) e Hubbard (1937), Missouri, EUA. As linhagens restantes (III-VII) agrupam vírus isolados na América do Sul. As linhagens mais divergentes (ancestrais) foram identificadas na Argentina, enquanto que, as menos divergentes se encontram na América do Norte, estes resultados sugerem que o SLEV se estabeleceu com sucesso primeiramente na América do Sul, anteriormente a sua evolução e dispersão para a América do Norte. Em um estudo anterior, a partir da análise de 43 isolados de SLEV através do método de fingerprintg (ONF – *oligonucleotide fingerprinting*) e da utilização de marcadores virulência, foram identificados seis grupos (quatro genótipos únicos do vírus nos Estados Unidos e dois genótipos na América do Sul) (TRENT *et al*, 1980; TRENT *et al* 1981), também agrupados geograficamente [EUA Central e Atlântico; epidêmico da Florida; enzoótico da Florida; Oeste dos EUA; América do Sul e Central (virulência mista); América do Sul (baixa virulência)] e de acordo com a virulência (alta virulência, virulência intermediária e baixa virulência). A neuroinvasão do vírus em camundongos e macacos esta correlacionada ao padrão do ONF e origens geográficas dos isolados, onde 90% das linhagens Norte Americanas foram classificadas como altamente virulentas e 10% classificadas como de virulência intermediária, entre os vírus isolados em anos

de epidemias, e somente 29% foram classificadas como altamente virulentas entre os isolados de anos não epidêmicos. Apesar do baixo nível de infecções humanas, 52% dos isolados da América Central e do Sul foram classificados como altamente virulentos enquanto 48% eram parcial ou completamente atenuados em camundongos (TRENT *et al*, 1980; MONATH *et al*, 1980).

Um estudo de RODRIGUES *et al*, 2010, demonstrou a partir de uma análise filogenética baseada na sequência codificadora completa do envelope viral (E) de 30 linhagens brasileiras, que o genótipo VIII está restrito ao Norte, na Região Amazônica, e o genótipo V se encontra amplamente distribuído por toda a América. Os genótipos III e V estão relacionados aos casos relatados de infecções humanas. Em um trabalho recente, o sequenciamento completo da amostra Be 355964, isolada de um paciente, demonstrou que esta pode ser classificada dentro do genótipo V (VEDOVELLO *et al*, 2015).

Tabela 2: Esquema de classificação do SLEV. Adaptado de Kramer & Chandler, 2001.

Linhagem	Grupo	Isolado	Localização	Ano	Hospedeiro	
I	A	E22924	Kern Co., CA	1970	<i>Cx. tarsalis</i>	
		Bfs4772	Kern Co., CA	1963	<i>Cx. tarsalis</i>	
		Bfs1750	Kern Co., CA	1953	<i>Cx. tarsalis</i>	
	B	PV7-3389	El Paso Co., TX	1987	<i>Cx. quinquefas.</i>	
		PVO-620	Dallas, TX	1989	<i>Cx. quinquefas</i>	
		Coav750	Riverside Co., CA	1998	<i>Cx. tarsalis</i>	
		Iv 824	Imperial Co., CA	1978	<i>Cx. tarsalis</i>	
		Soue135	Los Angeles, CA	1985	<i>Cx. Stigmatos.</i>	
		P17797	Dallas, TX	1966	Humano	
		72V1165	Chaves Co., NM	1972	<i>Cx. tarsalis</i>	
		68V1587	Hale Co., TX	1968	<i>Cx. inornata</i>	
		TD6-4G	Dallas, TX	1966	<i>Cx. pipiens</i>	
		72V4749	Washington Co.,CO	1972	<i>Cx. tarsalis</i>	
	II	A	L695121.05	South Florida	1969	<i>Cx. nigripalpus</i>
			69M1143	Polk Co., FL	1969	<i>Procyon lotor</i>
Kent904			Calvert City, KY	1956	<i>Colaptes auratus</i>	
Tex16017			Texas	?	desconhecido	
TexU1193			Texas	?	desconhecido	
TexM6			Texas	?	desconhecido	
Texas1955			Rio Grande Valley, TX	1955	Humano	

		SpAn9398	Sao Paulo, Brazil	1968	Akodon sp
	B	83V4953	Houston, TX	1983	<i>Cx. quinquefas</i>
		PV1-2419	Corpus Christi, TX	1991	<i>Cx. quinquefas</i>
		98V3181	Houston, TX	1998	<i>Cx. quinquefas</i>
		TNM4711K	Memphis, TN	1974	<i>Cx. pipiens</i>
		GHA-3	Tampa Bay, FL	1962	Humano
	C	Imp1311	Imperial Co., CA	1991	<i>Cx. tarsalis</i>
		Chlv587	Riverside Co., CA	1992	<i>Cx. quinquefas</i>
		Chlv374	Riverside Co., CA	1991	<i>Cx. tarsalis</i>
		Imp917	Imperial Co., CA	1988	<i>Cx. tarsalis</i>
		Kern217	Kern Co., CA	1989	<i>Cx. tarsalis</i>
		75v14868	Memphis, TN	1975	<i>Cx. pipiens</i>
		MSI-7	Mississippi	1975	<i>Passer domesticus</i>
		75256PG-3	Maryland	1975	<i>Cx. pipiens</i>
		VP34	Prince Georges City, MD	1977	<i>Cx. pipiens</i>
		FortWash	Maryland	1977	<i>Cx. pipiens</i>
		FL79-411	Florida	1979	<i>Cx. nigripalpus</i>
	D	P15	Tampa Bay, FL	1962	<i>Cx. nigripalpus</i>
		TBH-28	Tampa Bay, FL	1962	Humano
		65V310	Mexico	1965	<i>Butorides virescens</i>
		PanAn902604	Panama	1973	Cormorant
	E	Hubbard	St. Louis, MO	1937	Humano
		Parton	St. Louis, MO	1933	Humano
	F	Gmo94	Guatemala	1969	<i>Cx. nigripalpus</i>
III		79V2533	Sante Fe, Argentina	1979	<i>Cx. spp</i>
		Gml902612	Panama	1973	<i>Haemag. equinus</i>
		PanAn902745	Panama	1973	<i>Haemag. lucifer</i>
IV		Gml902984	Panama	1977	<i>Mansonia dyari</i>
		Gml902981	Panama	1977	<i>Mansonia dyari</i>
		Gml900968	Panama	?	desconhecido
	A	BeAn242587	Belem, Brazil	1973	Cx. declarator
		75D90	Peru	1975	Mosquito sp
		BeAn248398	Brazil	?	desconhecido
		78V6507	Santa Fe, Argentina	1978	<i>Cx. pipiens</i>
V		BeAn246407	Belem, Brazil	1973	Hylo. poecilonota
		TR9464	Trinidad	1955	<i>Psorophora ferox</i>
	B	BeAn246262	Belem, Brazil	1972	Opossum
		BeH203235	Brazil	1971	Humano
		BeAr23379	Belem, Brazil	1960	Sabethes belisarioi
VI		GML903797	Panama	1983	Aves sentinelas
VII		CorAn9124	Argentina	1966	<i>Calom. musculus</i>
		CorAn9275	Argentina	1967	<i>Mus musculus</i>

1.3 Aspectos Gerais da biologia dos Flavivírus

1.3.1 Estrutura e genoma viral

Os Flavivírus são pequenos vírus envelopados, com simetria icosaédrica, que medem cerca de 45-55 nm de diâmetro (figura 2). Possuem genoma de RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade positiva, com aproximadamente 11.000 kilobases de tamanho (11Kb) (RICE *et al*, 1985). O RNA genômico possui uma estrutura “cap” do tipo I na extremidade 5’ (m7gpppAmp) e não apresenta uma cauda poliA na extremidade 3’ (Wengler, WENGLER & GROSS, 1978), é composto de uma região 5’ não codificadora (UTR - *untranslated region*) contendo aproximadamente 96 nucleotídeos, uma única janela aberta de leitura (ORF- *open reading frame*) contendo ~ 10300 nucleotídeos e uma região 3’ terminal não codificadora (UTR) contendo ~ 631 Nucleotídeos. A ORF viral codifica uma poliproteína precursora, que após sofrer processamento co- e pós-traducional por proteases virais e celulares origina três proteínas estruturais que compõem a partícula viral, capsídeo (C), membrana (M, que é expressa como o precursor da proteína M, prM) e envelope (E), e sete proteínas não estruturais essenciais para a replicação viral (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Mukhopadhyay *et al*, 2005), organizadas na seguinte ordem – C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (figura 3).

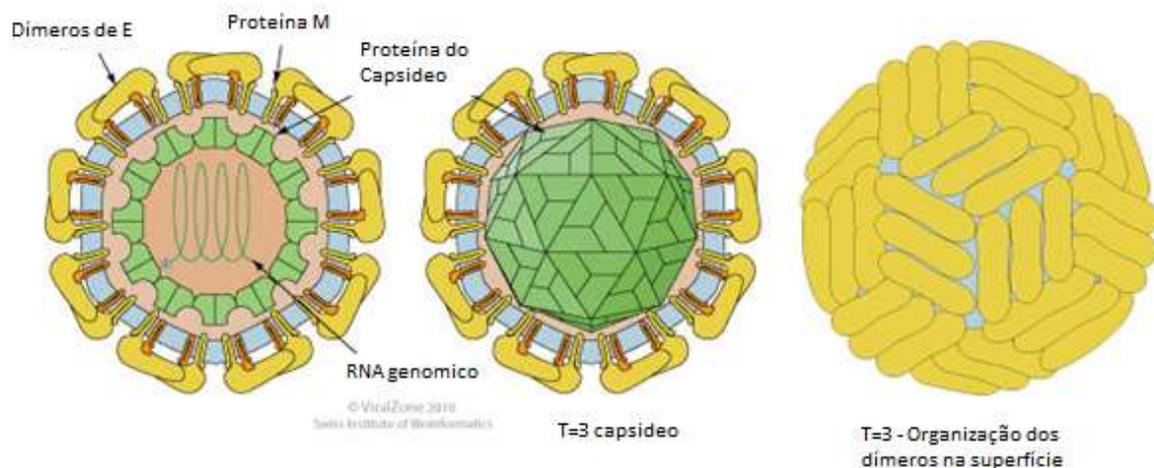


Figura 2: Estrutura esquemática dos vírus da família Flaviviridae – Estão representadas as proteína do envelope (E), proteína de membrana (M), proteína do capsídeo (C) e genoma viral composto por RNA fita simples. Disponível em: <http://flavivirus.wordpress.com/general-flavivirus-info/>

As regiões 3' e 5' UTR são altamente variáveis entre os Flavivírus, mas ambas apresentam estruturas secundárias comuns em forma de haste-alça (*Stem loop* - SL) (BRINTON & DISPOTO, 1988; MARKOFF, 2003) que são importantes durante os processos de replicação e tradução viral, já que diversas replicases virais (NS3, NS5) interagem com estas estruturas (CHEN *et al*, 1997) e oligonucleotídeos complementares a estas regiões inibem estes processos (DEAS *et al*, 2005; HOLDEN *et al*, 2006). Próximo à região 3' UTR se encontra também uma sequencia complementar ao inicio do gene do capsídeo viral (na região 5'), denominada sequencia de circularização, e esta interação RNA-RNA também é importante durante o processo de replicação viral (HOLDEN *et al*, 2006).

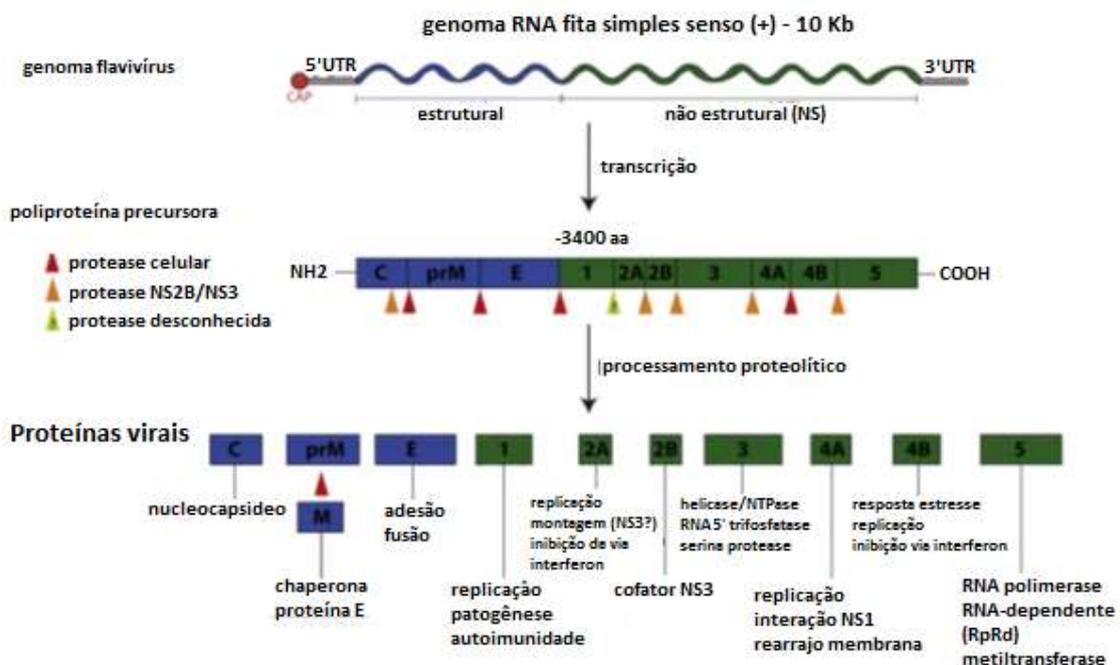


Figura 3: Organização do genoma e funções das proteínas virais (Adaptado de PASTORINO *et al*, 2010)

1.3.2 Proteínas virais

A proteína do capsídeo (C) (~11kDa) possui aproximadamente 120 aminoácidos e esta presente no nucleocapsídeo. Ela apresenta caráter básico, o que provavelmente auxilia no empacotamento do RNA viral neutralizando a sua carga negativa (RICE *et al*, 1985) e apresenta uma região interna hidrofóbica que auxilia na associação com a membrana celular e uma região C-terminal também hidrofóbica que atua como um peptídeo sinal para a translocação de prM ao retículo endoplasmático (RE), sendo que este domínio é clivado posteriormente da proteína C madura por uma serina protease viral (LINDENBACH *et al*, 2007).

A prM (~26kDa) é uma glicoproteína precursora da proteína estrutural M e provavelmente funciona como um chaperona, auxiliando na montagem correta e enovelamento da proteína E (MUKHOPADHYAY *et al*, 2005). A principal função de prM é prevenir o rearranjo da proteína E, para a sua forma fusogênica, durante o seu transporte pela via secretória, devido ao pH ácido, já que a conversão das partículas virais imaturas em vírions maduros ocorre na via secretória e coincide com a clivagem de prM nos fragmentos pr e M (LINDENBACH *et al*, 2007). Esta clivagem tardia de prM esta relacionada então à maturação viral e evita que os vírions imaturos se fusionem à membrana celular hospedeira, impedindo sua disseminação (LI *et al*, 2008).

A proteína E (~53kDa) é a maior proteína de superfície dos vírions e medeia a interação com os receptores celulares e a fusão com a membrana da célula alvo. A proteína E apresenta três domínios estruturais, denominados EDI, EDII e EDIII (REY *et al*, 1995). O provável peptídeo de fusão, que medeia o processo de inserção à membrana celular, está localizado na extremidade de EDII, distante da região transmembrana, e EDIII esta envolvida na ligação aos receptores celulares, além de ser o maior alvo para anticorpos neutralizantes (LINDENBACH *et al*, 2007).

As proteínas não estruturais dos Flavivírus são importantes para o processamento da poliproteína, a replicação do RNA e o empacotamento viral. A glicoproteína NS1 (~46kDa) se encontra retida dentro da célula, mas também pode ser encontrada na superfície celular, além de ser secretada em pequena quantidade nas células de mamíferos (LINDENBACH *et al*, 2007). Esta proteína desempenha um importante papel no processo de replicação do RNA viral, se localizando nos sítios de replicação do RNA (MACKENZIE *et al*, 1996). As funções das formas extracelulares de NS1 ainda não estão totalmente elucidadas, no entanto, durante a infecção elas estimulam uma forte resposta humoral e os anticorpos dirigidos contra as proteínas de superfície podem conduzir a lise de células infectadas via complemento (Lindenbach & Rice, 2003), anticorpos anti-NS1 também podem conferir uma proteção parcial após o desafio com o vírus (FALGOUT *et al*, 1990; JACOBS *et al*, 1992; LIN, *et al*, 1998; SCHLESINGER *et al*, 1993).

NS2A é uma pequena proteína hidrofóbica (~22kDa) associada a membrana, que está envolvida no processo de replicação e empacotamento viral, ela também se localiza nos sítios de replicação do RNA e interage com as replicases virais NS3 e NS4, assim como, com a região 3' UTR do genoma viral (LINDENBACH *et al*, 2007). NS2B também é uma pequena proteína associada à membrana que forma um complexo estável com NS3 e age como cofator para a atividade catalítica desta serina-protease viral (FALGOUT *et al*, 1991).

NS3 (~70kDa) é uma proteína multifuncional necessária para o processamento da poliproteína e para a replicação do RNA viral (LINDENBACH *et al*, 2007). A clivagem co- e pós-traducional da poliproteína é realizada pela NS3 na porção citoplasmática do RE e por proteases celulares no lúmen do RE para dar origem a proteína madura (ASSENBERG *et al*, 2009) (figura 4). Um terço da porção N-terminal da proteína contém a protease viral (NS3pro), que requer uma porção de NS2B para a sua atividade catalítica, enquanto o restante da proteína (NS3hel) apresenta a função de helicase, NTPase (nucleosídeo 5' trifosfatase) e RTPase (RNA 5' trifosfatase), que são fundamentais para a

replicação viral e para a reação de *capping* da extremidade 5' do RNA viral (LINDENBACH & RICE, 2003).

NS4A (~16kDa) e NS4B (~27kDa) são pequenas proteínas hidrofóbicas, NS4A esta localizada nos sítios de replicação do RNA (MACKENZIE *et al*, 1998) e interage com NS1, sendo essencial para o processo de replicação do RNA (LINDENBACH & RICE, 2003) e NS4B se localiza com NS3 e com o RNA viral fita dupla (dsRNA- *double stranded RNA*) em possíveis sítios de replicação de RNA derivados de estruturas da membrana do RE (MILLER *et al*, 2006), e se liga a porção C-terminal de NS3, permitindo a sua dissociação do RNA fita simples (ss-RNA- *single stranded RNA*) e a sua ligação a um novo duplex, aumentando assim, a atividade de helicase de NS3 (UMAREDDY *et al*, 2006).

NS5 (~103kDa) é a maior e mais conservada proteína entre os Flavivírus, possuindo atividade de metiltransferase e RpRd (RNA polimerase dependente de RNA) sendo importante para a replicação e para a formação do “cap” no 5' do RNA viral (LINDENBACH *et al*, 2007). NS5 também interage com NS3 aumentando a sua atividade de NTPase e RTPase (CUI *et al*, 1998; YON *et al*, 2005).

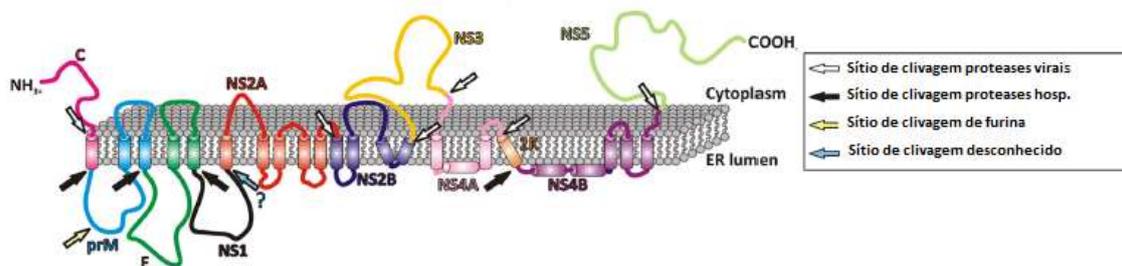


Figura 4: Diagrama esquemático do processamento da poliproteína precursora dos Flavivírus e formação das proteínas virais. Organização da poliproteína na membrana do RE com os sítios de processamento de proteases celulares e virais (setas); a poliproteína precursora é dirigida ao RE da célula hospedeira por sequências siniais, onde NS1 e o domínio exógeno de prM e E se localizam no lúmen do RE, enquanto que, C, NS3 e NS5 são citoplasmáticos. NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são proteínas transmembrana hidrofóbicas, com pequenos segmentos hidrofílicos. A clivagem pós- e co-

traducional da poliproteína é realizada por NS3 na porção citoplasmática e por proteases celulares no lúmen do RE. (Adaptado de ASSENBERG *et al*, 2009).

1.3.3 Ciclo de multiplicação viral

Durante a infecção celular, os vírions dos Flavivírus se ligam, através da glicoproteína do envelope (E), a receptores específicos presentes na superfície celular e são internalizados por endocitose. No interior da vesícula endocítica, a redução do pH desencadeia uma mudança conformacional irreversível, de dímero para trímero, na proteína E, esta alteração permite a fusão do envelope à membrana endossomal da célula hospedeira e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após o desnudamento do capsídeo, ocorre a tradução imediata do RNA viral a síntese da poliproteína precursora. Após processamento da poliproteína por proteases virais NS2B/NS3 e do hospedeiro (figura 4), que dará origem as proteínas estruturais e não estruturais, a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd-NS5) inicia a síntese dos RNA fita negativa a partir do RNA genômico, o qual por sua vez, originará novas fitas positivas. A replicação do genoma ocorre em invaginações da membrana induzidas pela NS4, estas estruturas servem para ancorar os complexos de replicação formados pelo RNA e proteínas virais, e ainda por fatores do hospedeiro. Partículas virais imaturas são montadas dentro do reticulo endoplasmático (RE), onde o RNA viral é associado às proteínas do capsídeo (C) e empacotado em uma bicamada lipídica, proveniente do próprio RE, contendo heterodímeros de prM e E. O precursor de M é clivado por furinas celulares, na rede trans-Golgi, portanto, ao longo da via secretória ocorre a maturação da partícula viral (PASTORINO *et al*, 2010). O vírions maduros podem então ser liberados por exocitose para o meio extracelular (figura5).

Os flavivírus infectam o hospedeiro a partir da picada de um mosquito infectado. Os vírus se multiplicam em células presentes no local da infecção (endoteliais, fagocíticas) e atingem altos títulos em um curto período de tempo. A viremia facilita a transmissão para novos artrópodes não infectados.

Posteriormente, o vírus se dissemina através dos linfonodos drenantes, onde ocorre mais uma ciclo de amplificação antes que estes consigam ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), no caso dos vírus que causam encefalite. O mecanismo de invasão da BHE ainda não está completamente elucidado, mas pode ser resultado do processo de inflamação e dano da integridade vascular, penetração através do bulbo olfatório, penetração mediada por receptores do tipo Toll ou transcitose através de células vasculares endoteliais (PASTORINO *et al*, 2010).

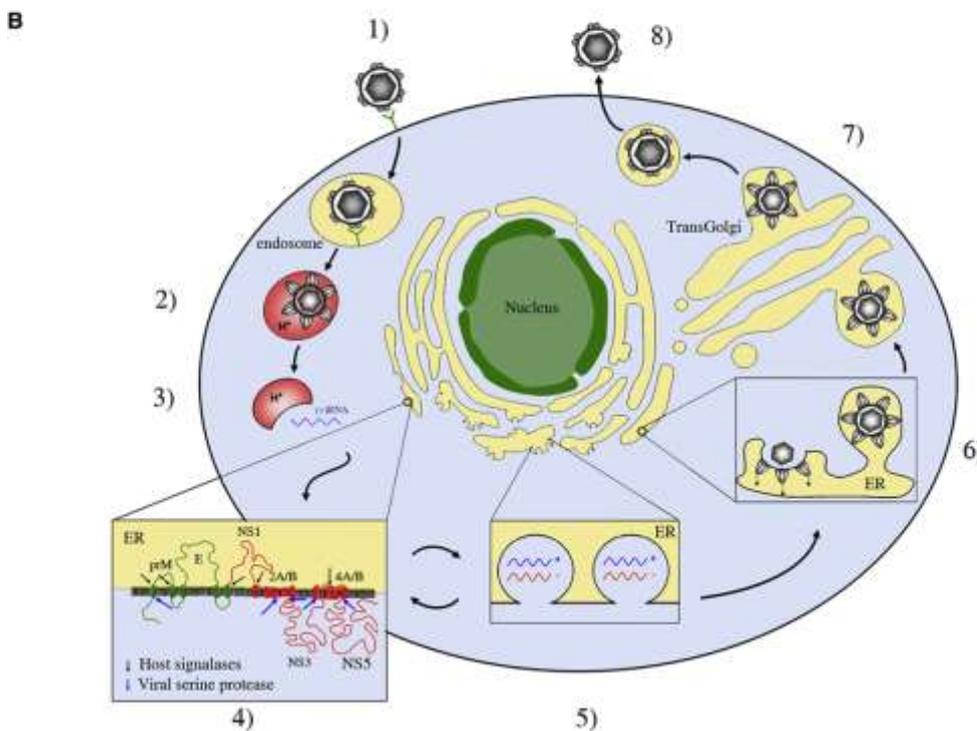


Figura 5: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos Flavivírus. As etapas do ciclo de multiplicação dos Flavivírus são assim caracterizadas: (1) Os vírions se ligam a receptores específicos presentes na superfície celular; (2) e são internalizados por endocitose; (3) a redução do pH na vesícula endocítica, permite a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma; (4) logo após, ocorre a tradução do RNA viral e a síntese da poliproteína precursora; (5) seguida da replicação do RNA viral (6 e 7) e da montagem e maturação da partícula viral; (8) a liberação o vírion ocorre por exocitose. (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009)

1.3.4 Interações vírus-hospedeiro

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que desenvolveram complexas estratégias para completar o seu ciclo de multiplicação, que vão desde mecanismos para suprimir e evadir a resposta imune do hospedeiro, assim como, mecanismos para controlar as principais vias sinalizadoras celulares (PAGANO *et al*, 2013). Desta maneira, eles conseguem explorar processos celulares envolvidos na replicação e transcrição do seu material genético, tradução, tráfego de proteínas, além de permitir que as proteínas virais sofram modificações pós-traducionais, como fosforilação, ubiquitinação, glicosilação, clivagem, etc (PAGANO *et al*, 2013). Os flavivírus, por exemplo, interagem durante o seu ciclo de multiplicação com diversos fatores celulares do hospedeiro, como Receptores de Reconhecimento de Patógenos (PRRs), grânulos de resposta a estresse e estruturas da membrana, além de terem desenvolvido diversos mecanismos para neutralizar a resposta antiviral (FERNANDEZ-GARCIA *ET AL*, 2009).

Os receptores de lectina tipo C (CLRs) são PRRs especializados na detecção de patógenos invasores, eles são altamente expressos em células da linhagem mielóide, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs). Estudos confirmam que o receptor DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) é um CLR explorado pelos quatro sorotipos do DENV e por linhagens glicosiladas de WNV durante a infecção de DCs imaturas. A infecção mediada pelo DC-SIGN é essencial para a maturação das DCs, e a migração das DCs dos sítios de infecção para os linfonodos, onde estas irão apresentar os antígenos processados aos linfócitos T, desempenha um papel crítico para a disseminação e a patogênese. Além do DC-SIGN, outros receptores também já foram identificados (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009). Estudos também já confirmaram a importância das vias de endocitose mediada por clatrina e da ATPase H⁺ vacuolar (vATPase), que regula a acidificação do endossomo, para o processo de internalização e desnudamento do capsídeo no citoplasma (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009). Outros fatores celulares, como as tirosinas cinases c-Yes e c-Src já foram

associadas à etapa de montagem da partícula viral (CHU & YANG, 2007; HIRSCH *et al*, 2005).

Os flavivírus são capazes de manipular a função de grânulos de estresse (SG) e de corpos de processamento (PB) para beneficiar a sua replicação e patogênese. As proteínas de ligação ao RNA, TIA-1 e TIAR, envolvidas na formação dos SG, interagem com haste-alças presentes na região 3' da fita negativa de RNA do WNV e possivelmente influenciam na síntese do RNA genômico viral. Ambas as proteínas, TIA-1 e TIAR, são sequestradas para os sítios de replicação viral e conseqüentemente a produção dos grânulos de estresse é inibida, este processo, também já observado para o DENV, provavelmente, representa uma estratégia comum utilizada pelos flavivírus para prevenir a inibição da tradução do mRNA viral e também aumentar a síntese de RNA (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009). Estes vírus também parecem subverter o decaimento do mRNA 5'-3' promovido pela exoribonuclease XRN1, pertencente aos PB, sendo capazes de gerar um RNA não codificante único (ncRNA ou sfRNA - RNA subgenômico) de 0,3-0,5 Kb, essencial para a sua patogênese. Uma estrutura altamente conservada entre os membros da família presente na região 3' UTR (SLII) do RNA viral é responsável pela resistência dos ncRNA a atividade da exoribonuclease (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009).

Os flavivírus também provocam rearranjos em estruturas da membrana celular, próximas à região perinuclear, com o objetivo de estabelecer um microambiente ideal durante formação do complexo de replicação para a amplificação do RNA. Estruturas esféricas, de aproximadamente 50-150nm de diâmetro, denominadas pacotes de vesículas (VP), são observadas em células infectadas por flavivírus, e diversas proteínas não estruturais virais e moléculas de dsRNA estão presentes nestes pacotes. Os VP são provenientes de invaginações do retículo endoplasmático (RE), e estes apresentam um poro que permite a importação de fatores do hospedeiro e nucleotídeos para a replicação do RNA e também permite a exportação do genoma viral recém-sintetizado. Uma das razões dos flavivírus “empacotarem” sua maquinaria de

replicação nestas estruturas pode estar relacionada a um aumento na eficiência da replicação, devido à concentração e ao ancoramento das proteínas virais nestes locais, além disto, estas VPs podem ser úteis para evitar que o RNA viral seja reconhecido através das respostas celulares ativadas por dsRNA (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009).

A manipulação de vias celulares envolvidas na biossíntese de colesterol pelo vírus também pode representar uma estratégia desenvolvida pelos flavivírus para facilitar a replicação viral e a evasão da resposta imune. A infecção pelo WNV leva a redistribuição do colesterol celular e a formação das membranas requeridas na replicação viral pela enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase (HGCR), responsável pela síntese de colesterol. O silenciamento da expressão do gene codificador para a enzima por RNAi e a utilização de drogas moduladoras de colesterol inibem fortemente a replicação do vírus. Outra consequência da redistribuição do colesterol é a perda da função das balsas lipídicas e a inibição da via de sinalização de interferon. Nas células infectadas a fosforilação e translocação de STAT-1 para o núcleo em resposta ao IFN- α é reduzida, e este quadro pode ser parcialmente revertido pela adição de colesterol exógeno (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009).

As proteínas não estruturais NS2A, NS4A e NS5B do DENV e WNV já foram associadas à inibição da resposta por IFN tipo I, a expressão destas proteínas em células reduz a fosforilação de STAT-1. Estudos também já demonstraram que a NS1 do WNV é capaz de bloquear a via mediada por TLR3 e a indução do estado antiviral nas células. A proteína E é capaz de interferir na ubiquitinação de RIP-1, uma cinase sinalizadora comum às vias de RIG-1 e TLR3, sendo que somente as proteínas E viral derivadas de células de mosquito são capazes de exercer esse efeito, sugerindo um mecanismo de evasão imune no início da infecção do hospedeiro vertebrado. Estudos com flavivírus como o DENV, o JEV, os vírus transmitidos por carrapatos, revelaram que a NS5 atua também com um antagonista de interferon inibindo a fosforilação das cinases associadas a receptor Jak1 e TyK2, sendo que a inibição de Jak1 e TyK2 também ocorre na infecção pelo WNV (FERNANDEZ-

GARCIA *et al*, 2009). Ao contrário de muitos vírus que inibem a expressão do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC-I), a infecção com flavivírus parece aumentar a expressão do MHC-I e tal fato pode não ser apenas acidental, mas sim representar um atributo evolutivo importante com consequências funcionais ao inibir a atividade citolítica de células *natural killers* (NK). O aumento da expressão do MHC-I pode resultar no aumento da resposta por linfócitos T citotóxicos (CTL) em estágios mais tardios da infecção, mas isso não representa uma desvantagem para os flavivírus, já que estes parecem sofrer uma pressão seletiva maior de uma resposta imune inata ao invés de uma resposta adaptativa. Os flavivírus como DENV, WNV, JEV, SLEV, entre outros, não estabelecem uma infecção persistente, portanto, estes vírus precisam ser capazes de atingir rapidamente altos títulos no hospedeiro vertebrado para aumentar a probabilidade de transmissão ao vetor artrópode, e como consequência uma resposta adaptativa pode não exercer uma pressão evolutiva significativa nesta família viral (FERNANDEZ-GARCIA *et al*, 2009).

Diante destes fatores, nos últimos anos, diversos trabalhos tem tentado elucidar melhor as interações que ocorrem entre o vírus e a célula hospedeira e também as modificações estruturais e funcionais que estas interações promovem, buscando assim, como novos alvos antivirais, estes complexos proteicos formados entre as proteínas virais e celulares. Dentre os alvos pesquisados estão algumas proteínas cinases relacionadas às vias sinalizadoras celulares que serão detalhadas abaixo no texto.

1.4 Proteínas cinases

As proteínas cinases são uma família de enzimas que catalisam a transferência de um grupo γ fosfato de ATP, e em casos excepcionais, de GTP, para o grupo hidroxila de resíduos específicos de treonina, serina (cinases específicas para Ser/Thr) ou de tirosina (cinases específicas para Tyr) (SILVA *et al*, 2009). A fosforilação destes resíduos modula a atividade de diversas enzimas e cria sítios de ligação para o recrutamento de outras proteínas sinalizadoras, sendo, portanto, as proteínas cinases, importantes mediadores

da sinalização celular através da propagação de cascatas de fosforilação. Estas cascatas de fosforilação são desencadeadas por diversos estímulos extracelulares ou intracelulares, como hormônios, neurotransmissores, privação de nutrientes, e outros tipos de estresse (TAYLOR & KORNEV, 2011), além de ligantes virais, etc., e fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade proteica e para regulação da expressão genica. Esta regulação é importante para os processos de crescimento, proliferação, diferenciação, migração, metabolismo celular, etc.

O papel central destas cinases na sinalização celular exige um mecanismo de regulação efetivo para que a transdução dos sinais ocorra com fidelidade diante da complexa diversidade proteica celular. Portanto, uma maquinaria eficaz de regulação, presente em todas as proteínas cinases eucarióticas, permite que estas sejam capazes de alternar entre um estado catalítico ativo ou inativo rapidamente e de forma transiente em resposta a estímulos específicos (TAYLOR & KORNEV, 2011). Este processo de regulação das proteínas cinases é crítico devido à importância destas enzimas para o controle da atividade celular e a sua desregulação ou super-expressão pode ocasionar diversas doenças ou desencadear processos de proliferação celular descontrolada, levando a transformações malignas observadas em inúmeros cânceres, além de ser explorado por diferentes patógenos intracelulares durante a invasão da célula hospedeira.

1.4.1 Tirocinas cinases - Família Src de tirocinas cinases (SFKs)

As tirocinas cinases (PTKs, do inglês *protein tyrosine kinases*), são proteínas que catalisam a fosforilação dos resíduos de tirocina e podem ser classificadas em dois grupos: o grupo das tirocinas cinases receptoras (RTKs – *receptor tyrosine kinases*) que são glicoproteínas transmembrana, ativadas e auto-fosforiladas por um ligante extracelular, e incluem os receptores para insulina e muitos fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de

crescimento nervoso (NGF); o outro grupo é composto pelas tirosinas cinases não receptoras (NRTKs, *nonreceptor tyrosine kinases*) citoplasmáticas, que integram as cascatas de sinalização e podem ser ativadas pelas RTKs ou por outros receptores celulares como os receptores acoplados a proteína G e por receptores do sistema imune. As NRTKs incluem a família Src de tirosinas cinases (SFKs, *Src family tyrosine kinases*), que representam a maior família de tirosinas cinases não receptoras compostas por nove membros (c-Src, c-Yes, Fyn, c-Fgr, Lyn, Hck, Lck, Blk, Frk), as Janus cinases (Jaks), Abl, entre outras (HUBBARD & TILL, 2000).

Algumas NRTKs se encontram ancoradas a membrana plasmática através de modificações em sua região amino-terminal (N-terminal), como miristolação, que permite a associação estável com “balsas lipídicas” (ONEYAMA *et al*, 2009), e que esta presente em todas as SFKs, e de palmitolação, presente em todas as SFKs, com exceção de c-Src e Blk. Além de domínios para interação com lipídios, as NRTKs apresentam domínios que permitem a interação com proteínas e com ácidos nucleicos. Os principais domínios de interação proteína-proteína são os domínios homólogos a Src 2 (SH2) e 3 (SH3), presentes em muitas NRTKs. No entanto, algumas não apresentam estes dois domínios, mas sim domínios específicos destas subfamílias, como Jak que apresenta domínios de ligação à porção citoplasmática de receptores de citocinas, e a NTRK Fak que apresenta dois domínios, um de ligação a integrinas e um de ligação a adesões focais. A NTRK Abl apresenta sinais de localização nuclear, sendo encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo, e além de SH2 e SH3, Abl também possui um domínio de ligação para actina F e para DNA (figura 6) (HUBBARD & TILL, 2000).

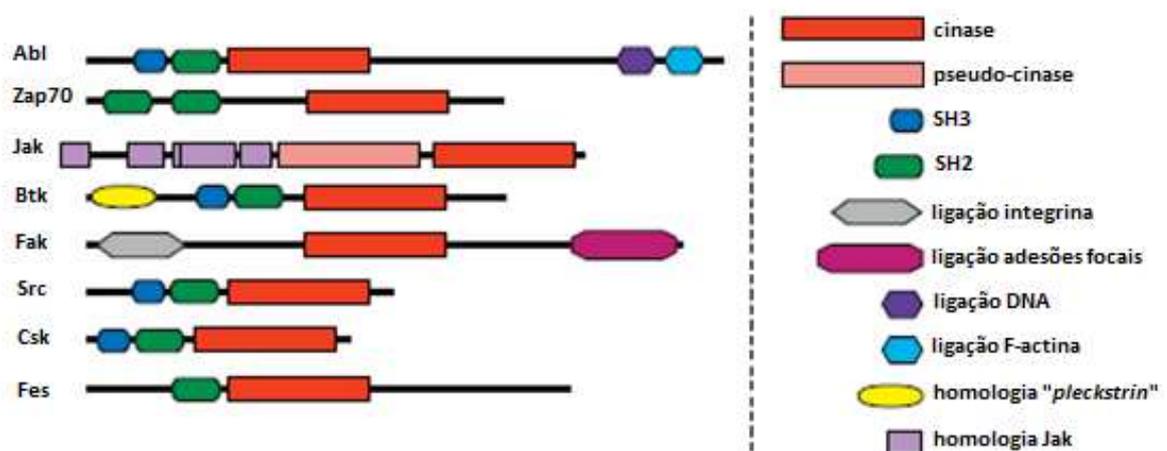


Figura 6: Organização dos domínios das principais subfamílias das NRTKs. A região amino-terminal esta a esquerda e a região carboxi-terminal à direita (Adaptado de HUBBARD & TILL, 2000).

As SFKs são expressas em diversos tipos de células animais (BROWN & COOPER, 1996) e se encontram associadas à membrana ou estão presentes em praticamente todos os compartimentos celulares (PAGANO *et al*, 2013). Elas regulam uma vasta gama de eventos celulares como crescimento, divisão, diferenciação, sobrevivência, morte celular, e também funções específicas como resposta imune, adesão e mobilidade celular, endocitose, etc. A sequência das SFKs é altamente conservada dentre os membros da família, com exceção de uma região N-terminal de 50 resíduos (OKADA, 2012). As SFKs podem ser divididas em cinco domínios funcionais – um domínio N-terminal único SH4, um domínio SH3 que se liga a motivos ricos em prolina, um domínio SH2 que reconhece motivos de fosfotirosinas, um domínio catalítico tirosina cinase SH1, e um domínio regulatório C-terminal (figura 7).

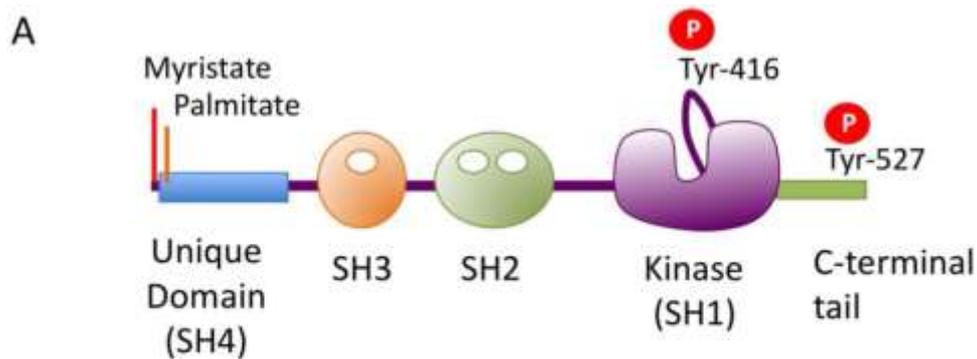


Figura 7: Organização dos cinco domínios funcionais das SFKs. A região amino-terminal esta representada a esquerda e possui sítios de miristoilação e palmitoilação, seguida dos domínios SH4, SH3, SH2, do domínio catalítico SH1 e da região carboxi-terminal reguladora (OKADA, 2012).

Em células quiescentes, as SFKs se encontram predominantemente fosforiladas na Tyr527 da região C-terminal, o que permite a ligação intramolecular da referida região ao domínio SH2, ocorrendo também a ligação de uma sequencia conectora de SH2 ao domínio de SH3. Estas interações determinam uma conformação inativa da enzima afetando a ligação de hidrogênio entre a Glu-310 na α C-hélice e a Lys-295, necessária para a ligação do Mg-ATP (figura 8-A). A ativação de c-Src, por exemplo, é negativamente regulada durante parte do ciclo celular, em condições basais, *in vivo*, 90-95% de c-Src se encontra fosforilada na Tyr527 (ROSKOSKI Jr, 2005). Portanto, as SFKs encontram-se inativadas pela fosforilação deste resíduo, e a desfosforilação da Tyr527 permite a liberação da região C-terminal do domínio SH2 e as alterações conformacionais posteriores permitem a restauração da ligação de hidrogênio ente Glu-310 e Lys-295 no domínio catalítico e a ativação da enzima, que pode agora catalisar a auto-fosforilação intramolecular da Tyr416 presente na alça de ativação, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (figura 8-B) (OKADA, 2012).

As SFKs interagem com diversas proteínas através dos resíduos de fosfotirosinas, reconhecendo as sequencias fosfopeptídicas através do domínio SH2. A cinase c-Sr, por exemplo, se liga as formas fosforiladas de Cas, FAK, e paxillin, assim como, a receptores de fatores de crescimento como EGFR,

CSF-1 e PDGF, resultando na sua ativação. A ativação de c-Src permite, então, a fosforilação destas mesmas proteínas criando novos sítios de ligação para outras proteínas adaptadoras ou efetoras e a amplificação do sinal. O domínio SH3 de c-Src também se liga a varias proteínas sinalizadoras que possuem motivos ricos em prolina, como Shc, PI3K, Cas, Tks5 e Arhgef5, e esta interação desestabiliza a conformação inativa das SFKs, que são ativadas e promovem a fosforilação destas proteínas (OKADA, 2012).

Quando o estímulo celular é finalizado, a SFks ativas são rapidamente degradadas via ubiquitina-proteassoma ou na maioria dos casos, são inativadas novamente pela fosforilação de Tyr-527. A tirosina cinase responsável pela fosforilação de Tyr-527 é denominada cinase C-terminal (Csk). A Csk, assim como as SFKs, é altamente conservada dentro do reino animal, desde protistas (*M. ovate*) até humanos, confirmando uma relação evolutiva entre as SFKs e a Csk (OKADA, 2012). Embora a Csk já tenha sido identificada como uma cinase reguladora negativa das SFKs, as fosfatases que ativam as SFKs, ao desfosforilarem Tyr-527, ainda não foram identificadas com certeza, algumas candidatas são PTP α , PTP ϵ , PTP λ , CD45 e PTP1B, SHP-1, e SHP-2 (OKADA, 2012).

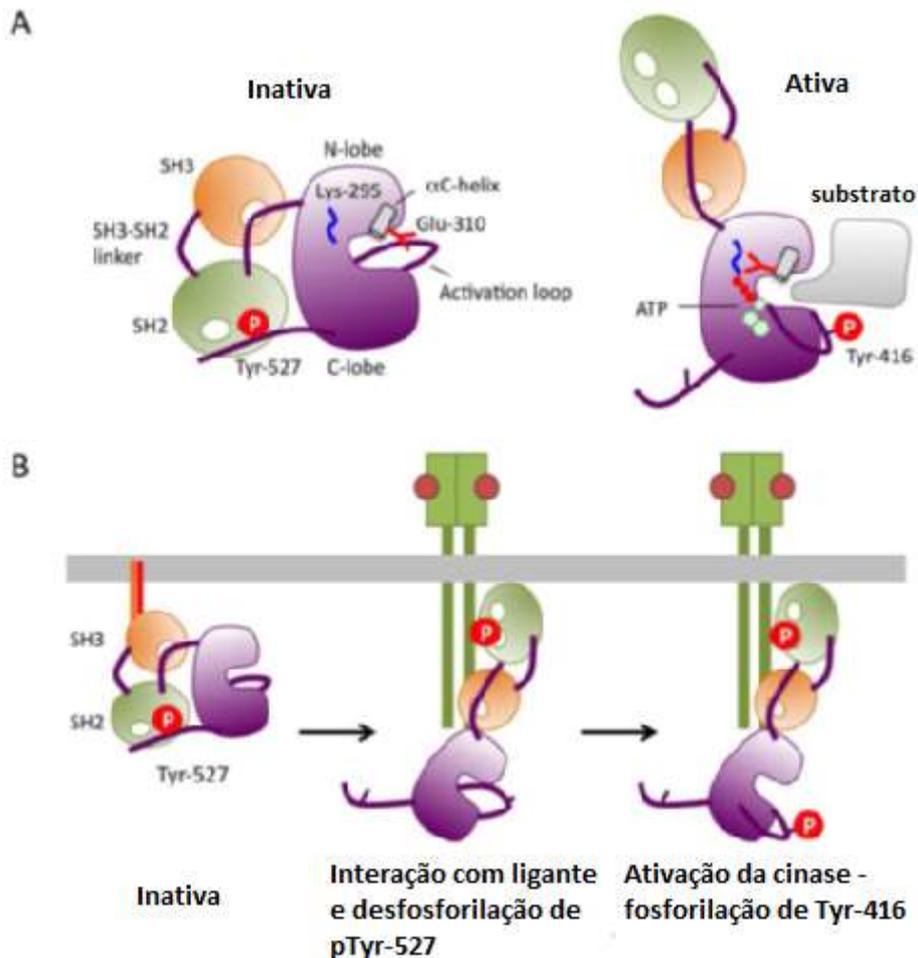


Figura 8: Modelo esquemático ativação de c-Src. A - conformações ativa e inativa da cinase c-Src. B- Mecanismo descrito de ativação das SFKs (OKADA, 2012).

1.4.2 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação de diversos mecanismos celulares como a embriogênese, proliferação, diferenciação, apoptose celular, dentre outros (PEARSON *et al*, 2001, DHILLON *et al*, 2007, BONJARDIM, 2017). Todas as células eucariotas possuem diversas vias de MAPKs e este sistema de sinalização é altamente conservado, desde leveduras até humanos, apresentando três proteínas cinases: a primeira é a MAP- cinase-cinase-cinase (MAPKKKs), que fosforila e ativa a MAP- cinase-cinase (MAPKKs), que por sua vez, fosforila MAP-cinase (MAPKs). As MAPKs

quando ativadas, fosforilam suas proteínas alvo, muitas das quais são proteínas nucleares, como fatores de transcrição (COWAN & STOREY, 2003), e alteram o padrão de expressão gênica (figura 9). Normalmente, proteínas GTPases monoméricas [proteína trocadora de nucleotídeos tipo guanilato di ou tri fosfato (GDP/GTP)], do tipo Ras ou Rho (CARGNELLO & ROUX, 2011), servem como disparadores desta cascata e ativam as MAPKKKs.

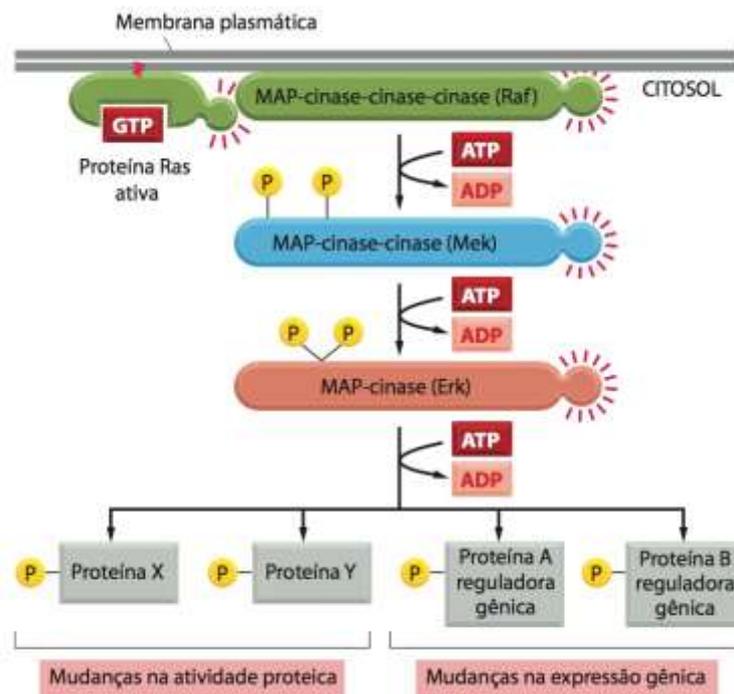


Figura 9: Módulo de fosforilação da serina-treonina-MAP-quinase ativado por Ras. (ALBERTS *et al*, 2010).

Na via de sinalização da Ras-MAP-quinase de células de mamíferos, estas três cinases são também denominadas Raf (MAPKKK), Mek (MAPKK) e Erk (MAPK), e existem pelo menos 14 MAPKKKs, 7 MAPKKs e 12 MAPKs descritas, sendo esta última, dividida em três famílias: a cinase regulada por sinal extracelular (ERK), a cinase c-Jun NH2-terminal ou proteína cinase ativada por estresse (JNK/SAPK) e a p38-MAPK (CARGNELLO & ROUX, 2011). Cada uma destas famílias apresenta também subfamílias: ERKs (ERK1 e ERK2), JNK (JNK1, JNK2 e JNK3) e p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) (figura 10). Em geral, as vias de ERK 1/2 são ativadas por fatores de crescimento e mitógenos, enquanto que as vias de JNK e p38 são ativadas por estresses

extracelulares (PEARSON *et al*, 2001), como irradiação ultravioleta, choque térmico, estresse osmótico e estimulação por citocinas inflamatórias. ERK1/2 são enzimas de aproximadamente 44 e 42 kDa, respectivamente, que compartilham 83% de semelhança (RAMAN *et al*, 2007). Elas são ativadas através da fosforilação dos motivos Thr-Glu-Tyr pelas MAPKK/ERK cinases MEK1 e MEK2, que por sua vez, são fosforiladas pela c-Raf (MAPKKK), ativada pela GTPase Ras (COWAN & STOREY, 2003, BONJARDIM, 2017). Quando ativadas, as ERK1/2 fosforilam um grande espectro de substratos, podendo ser translocadas para o núcleo, ativando fatores de transcrição, ou permanecer no citosol, onde agem sobre vários componentes, incluindo fatores envolvidos na retroalimentação negativa de ERK. No citoplasma, ERK1/2 regulam o processo de transcrição indiretamente, a partir da ativação da proteína cinase ribossomal S6 (p90 RSK S6 cinase - RSKs) (CARRIERE *et al*, 2008), que desempenham um papel importante na regulação de fatores transcricionais de diversos genes (c-Fos, CREB, SRF, Ets), envolvidos em mecanismos de proliferação, tumorigêneses, diferenciação, desenvolvimento, sobrevivência e migração celular (CARGNELLO & ROUX, 2011, BONJARDIM, 2017), ERK1/2 também promovem a ativação de IKK-Alpha (I-KappaB Kinase-Alpha) que resulta na translocação de NF-Kappa B para o núcleo, onde esta regula positivamente a transcrição de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, controle do crescimento celular e apoptose. No núcleo, ERK1/2 também atuam na expressão de diversos genes ativando diretamente fatores de transcrição como MSKs (proteínas cinases ativadas por estresse e mitógenos), c-Jun, Elk1, Sap1/2, c-Myc, fatores de transcrição de proteínas do citoesqueleto [MLCK (*Myosin Light Polypeptide Kinase*), Capn (*Calpain*), Pax6 (*Paxillin-6*) e FAK], e de proteínas STAT1/3 (transdutores de sinal e ativadores da transcrição) e receptores de estrógeno (CARGNELLO & ROUX, 2011).

Um dos mecanismos de retroalimentação negativa de ERK envolve a fosforilação da proteína adaptadora Sos, após o estímulo por fatores de crescimento, por exemplo, que desestabiliza o complexo Sos-GRB2 e interfere na ativação de Ras, a regulação negativa também ocorre pela fosforilação

direta de receptores de EGF (fator de crescimento epidérmico) e MKPs (MAP cinases fosfatases).

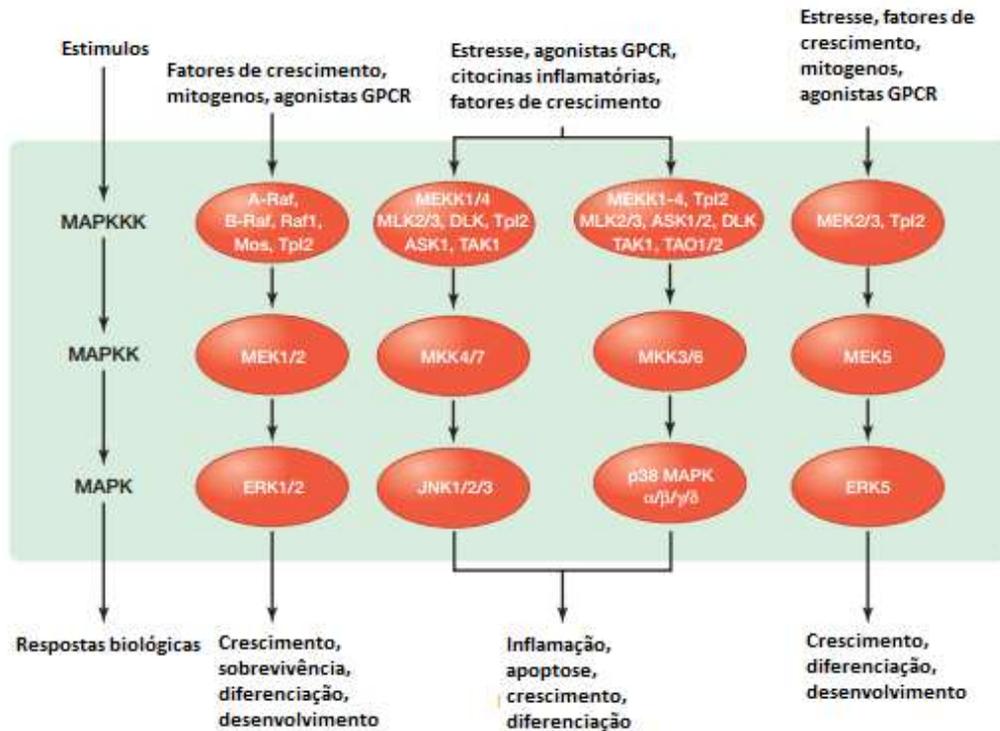


Figura 10: Fluxograma dos módulos de MAPK (ERKs, JNKs e P38). Esquema demonstrando o tipo de estímulo, os três níveis de cada cascata (MAPK, MAPKK e MAPKKK) e as várias respostas celulares ativadas pelas MAPK. Adaptado de MORRISON, 2012.

1.4.3 SFKs e MAPKs – importância no ciclo de multiplicação viral

Como já foi descrito, as SFKs desempenham um importante papel no metabolismo celular, portanto, elas podem participar de diversos processos celulares envolvidos em várias etapas do ciclo de multiplicação viral, como a sua penetração, internalização, replicação, morfogênese, disseminação ou liberação. As SFKs são um alvo importante na busca de fármacos antivirais e já tiveram o seu papel descrito para alguns vírus. Durante a penetração/internalização, diante da ligação aos seus respectivos receptores, as partículas virais induzem a ativação das SFKs, e estas no papel de transdutoras da sinalização celular mediada por receptores, ativam as vias de endocitose mediada por clatrin/caveolinas ou ativam mecanismos de

macropinocitose que permitem a penetração destas partículas e consequentemente o desnudamento e replicação do genoma viral. Portanto, independente da espécie viral, pode-se afirmar que as SFKs estão envolvidas na penetração viral simplesmente por “cumprirem o seu papel” ao retransmitir os sinais extracelulares, neste caso dos ligantes virais que se interagem com os receptores celulares, para outras moléculas efetoras e preparar o ambiente intracelular para a captação dos vírions por endocitose (PAGANO *et al*, 2013). Em um estudo recente, CHENG *et al* (2015), demonstraram que a ligação da glicoproteína G do vírus da febre efêmera bovina BEFV aos receptores celulares, induz a ativação das cascatas de Src-JNK-AP1 e PI3K-Akt-Nf-κB, e esta ativação aumenta a expressão de clatrina e dinamina 2 favorecendo o processo de penetração por endocitose do BEFV.

Uma interação direta entre as SFKs e as proteínas virais pode não ocorrer na fase de penetração, mas somente após o desnudamento da partícula e a síntese dos produtos gênicos virais (PAGANO *et al*, 2013). Estas interações das proteínas virais com as SFKs ocorrem entre os domínios não catalíticos (SH2 e SH3) e catalíticos (SH1) e podem resultar no redirecionamento das SFKs para outros compartimentos celulares ou afetar a sua atividade diretamente para que estas auxiliem na replicação do genoma, montagem ou disseminação da partícula viral (PAGANO *et al*, 2013). Um estudo demonstrou que a SFK Fyn está envolvida no mecanismo de replicação do DENV-2 e que, provavelmente, esta cinase é responsável pelo efeito inibitório observado durante a multiplicação viral após o tratamento com os inibidores família de Src (AZD0530 e dasatinib), foi verificado também que uma mutação na NS4B viral confere resistência a estes inibidores, assim como, ao RNAi específico para Fyn. O estudo também revelou que somente o dasatinib foi capaz de afetar a liberação da partícula viral, e que esse fato pode estar relacionado a inibição de AFK pelo inibidor (WISPELAERE *et al*, 2013). A inibição de c-Src pelo dasatinib já havia sido relacionada à etapa de montagem e maturação do DENV em um estudo anterior (CHU & YANG, 2007). Estudos com o inibidor PP2 de SFKs já havia demonstrado uma redução significativa no título do WNV, e foi demonstrado também que a tirosina cinase c-Yes, e não c-Src, é responsável

pela inibição ao afetar a etapa de maturação da partícula viral (HIRSCH *et al*, 2005). Durante a infecção pelo *Vírus da hepatite C* (HCV) a cinase Src interage, através dos domínios SH2 e SH3, com a NS5A e NS5B viral, respectivamente, e esta interação parece ser importante para manter a interação entre estas proteínas virais, o que é essencial para a replicação do vírus (BACARIZO *et al*, 2014; PFANNKUCHE *et al*, 2011; SHIMAKAMI *et al*, 2004). A fosforilação da NS5A pela tirosina cinase c-Abl é importante para a montagem da partícula viral (MASAKI & SUZUKI, 2015; YAMAUCHI *et al*, 2015) Pesquisas já demonstraram a interação entre as SFKs e diversas proteínas virais, podendo influenciar o ciclo de multiplicação celular, ou também a patogênese induzida por diversos vírus através ativação de outros fatores do hospedeiro, como por exemplo, o JEV (RAUNG *et al*, 2007; DAS *et al*, 2010); o *Andes virus* (ANDV) (GORBUNOVA *et al*, 2010), *Human Herpesvirus 4* (HHV-4) (ROVEDO & LONGNECKER, 2008), *Human Herpesvirus 1* (HHV-1) (LIANG & ROIZMAN, 2006; WAGNER & SMILEY, 2011); *Hepatitis B virus* (HBV) (KLEIN *et al*, 1999), *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) (MCCARTHY *et al*, 2014; BERTOLETTI *et al*, 2012); *Enterovirus C* (BOLEN *et al*, 1984), etc.

Assim como as SFKs, a ativação das MAPKs em células infectadas por diferentes vírus também parece ser necessária para o ciclo de multiplicação viral, incluindo a entrada, a transcrição de genes, a expressão proteica, e a montagem/disseminação ou patogênese (CEBALLOS-OLVERA *et al*, 2010), sendo que a importância das MAPKs já foi demonstrada em diversos estudos com diferentes vírus. Como o HIV-1 (ZHU *et al*, 2011, SHAPIRO *et al*, 1998), *Human betaherpesvirus 5* (HHV-5) (SUN *et al*, 2001), HHV-1 (QIN *et al*, 2011, DIAO *et al*, 2005, HARGETT *et al*, 2006, MCLEAN & BACHENHEIMER, 1999), *Human Herpesvirus 8* (HHV-8) (NARANATT *et al*, 2003), *Enterovirus B* (SI *et al*, 2005), *Cowpox virus* (CPXV) (SILVA *et al*, 2006), *Vaccinia virus* (VACV) (de MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al*, 2004; PEREIRA *et al*, 2012), o YFV (ALBARNAZ *et al*, 2014), *Porcine circovirus 2* (PCV2) (WEI *et al*, 2009), *Rotavirus* (HOLLOWAY & COULSON, 2006) e o DENV (CEBALLOS-OLVERA *et al*, 2010); DENV-2 e -3 (RIBEIRO, 2015, em preparação).

1.4.4 Inibidores Farmacológicos de SFKs e MAPKs

A desregulação de proteínas cinases tem demonstrado ser um importante mecanismo no qual as células cancerígenas conseguem ultrapassar as restrições fisiológicas normais de crescimento e sobrevivência (ZHANG *et al*, 2009). Neste contexto, o desenvolvimento de inibidores farmacológicos destas proteínas cinases é altamente explorado pela indústria farmacêutica e estas se tornaram uma classe de drogas extensivamente pesquisadas. Até o momento, diversos inibidores já receberam a aprovação do FDA (US Food and Drug Administration) para o tratamento de muitos tipos de câncer. No entanto, o espectro de utilização destes inibidores vai além desta enfermidade, já que a desregulação destas cinases também está associada a diversas desordens imunológicas, neurológicas, metabólicas e a diversos tipos de doenças infecciosas (ZHANG *et al*, 2009), incluindo as infecções virais (BONJARDIM, 2017).

A aplicabilidade destas cinases como alvo de fármacos se deve a diversos fatores, dentre estes, o fato de aproximadamente 518 cinases serem codificadas pelo genoma humano e um considerável número de processos celulares ocorrem por meio da transdução de sinais, via cascatas de fosforilação, indicando que a inibição destas cinases pode desencadear respostas fisiológicas efetivas (ZHANG *et al*, 2009), que no caso de uma infecção viral pode representar uma supressão do controle de processos celulares importantes. Outro fator importante é que, embora estas cinases apresentem um alto nível de conservação entre os seus sítios de ATP, moléculas altamente seletivas estão sendo desenvolvidas. Muitas vezes também a inibição da atividade destas cinases em células normais pode ser bem tolerada, um exemplo, é o inibidor dasatinib, que é capaz de inibir todos os nove membros da família de Src cinases, entre outras tirosinas cinases, e mesmo assim, exibir um espectro de efeitos colaterais muito mais brandos comparado à quimioterapia convencional no tratamento do câncer (ZHANG *et al*, 2009).

Nas proteínas cinases, a estrutura do cerne catalítico apresenta uma forma bilobada, com o sitio de ligação de ATP localizado na fenda formada entre estes dois lobos. O ATP se liga neste sitio por meio de pontes de hidrogênio formadas entre a sua adenina e um segmento presente em uma junção (“hinge”) que conecta os domínios amino e carboxi-terminal. A ribose e os grupos tri-fosfatos se ligam a um canal hidrofílico que se estende até o sitio de ligação do substrato, que possuem resíduos conservados essenciais para a catálise (figura 11). Todas as cinases apresentam uma alça de ativação que regula a sua atividade. Esta alça apresenta motivos conservados de aminoácidos DFG e APE no começo e no final da sua sequência, e como já descrito na revisão das SFKs, pode apresentar conformações cataliticamente ativas, geralmente fosforiladas, e conformações inativas, que bloqueiam o sitio de ligação de substrato. A grande maioria dos inibidores de proteínas cinases, são ATP competitivos e se ligam através de pontes de hidrogênio a aminoácidos presentes na junção da cinase alvo, mimetizando a ligação do ATP. Geralmente, estes inibidores não se ligam nas regiões de interação entre a cinase e o trifosfato ou a ribose da molécula de ATP, com exceção do inibidor I que interage com o sitio de ligação da ribose (ZHANG *et al*, 2009). Os inibidores ATP competitivos, na grande maioria, são classificados como inibidores do Tipo I, que reconhecem uma conformação ativa da cinase, também denominada “DFG in” (ZHANG *et al*, 2009).

Diante dos inúmeros estudos já realizados comprovando a importância das SFKs e das MAPKs durante a multiplicação dos flavivírus e de outras famílias virais, assim como, da eficácia de alguns inibidores farmacológicos no controle destas infecções, um dos objetivos deste trabalho, foi avaliar o efeito do tratamento com inibidores de tirosinas cinases da família de Src, (IF-Src-1 e IF-Src-2), em células infectadas com o SLEV.

O IF-Src-1 é um potente e reversível inibidor de Src e de outros membros da família como c-Yes, Fyn, Lyn, Blk, Fgr e Lck, sendo menos ativo para Abl e EGFR, este inibidor se encontra em testes clínicos fase II/III. A atividade antiproliferativa deste inibidor varia entre diferentes linhagens celulares,

apresentando uma concentração inibitória (IC₅₀) de 0,2->10µM. A inativação de Src pelo IF-Src-1 ocorre pela ligação deste ao sitio de ligação de ATP da cinase, e a afinidade deste inibidor pela forma ativa de Src é 10x maior comparado à conformação inativa (GREEN, 2009). O IF-Src-2 também é um inibidor ATP competitivo, que apresenta uma IC₅₀ de Src/Abl de 1.2 e 1 nM, respectivamente, em ensaios enzimáticos. Este inibidor já recebeu aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) e EU (European Medicines Agency) para o tratamento de adultos com Leucemia mieloide crônica, positivos para o cromossomo Filadélfia (Ph+) e se encontra em teste clínico para outros tipos de canceres.

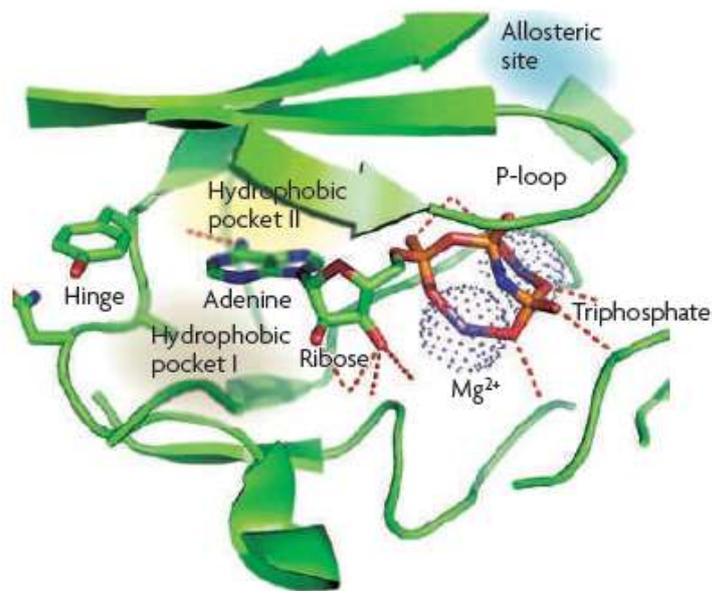


Figura 11: Estrutura esquemática do sitio de ligação de ATP de uma proteína cinase (AKT1) complexada com Mg-ATP. (ZHANG *et al*, 2009).

1.5 Modelos animais para SLEV

Apesar de poucos estudos terem sido realizados com o SLEV *in vivo*, a maioria deles relatam a influência da idade na susceptibilidade dos animais a infecção com o vírus, particularmente, quando infectados por via periférica. Estudos realizados com aves demonstram que pardais e pombos filhotes

geram uma viremia maior do que as aves adultas (BOWEN *et al*, 1980; MAHMOOD *et al*, 2004). No geral, os estudos com camundongos também demonstram que animais mais velhos geram uma viremia menor quando comparado aos animais mais novos (ANDERSEN & HANSON, 1974; REISEN, 2003; O'LEARY *et al*, 1941).

Um estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a virulência, em animais, de duas linhagens não epidêmicas do SLEV (78V-6507 e CorAn-9275) e da linhagem CbaAr-4005, responsável pelo surto de doença febril e encefalite em Córdoba, Argentina (2005). Os autores utilizaram camundongos Swiss (linhagem R-W1), com idades entre 7, 10 e 21 dias, infectados por via subcutânea e todos os animais inoculados com a linhagem CbaAr-4005 exibiram sinais da doença, sem diferenças significativas entre os grupos. No entanto, para as linhagens não epidêmicas, diferenças significativas foram encontradas entre os animais com 10 e 21 dias de idade, sendo que os animais com 21 dias exibiram pouco ou nenhum sinal da infecção. (RIVAROLA *et al*, 2014). Outro estudo, realizado para avaliar a variação da virulência entre várias isolados do SLEV, também demonstrou que animais infectados com idades de 2-4, 7-9 ou 21 dias, não apresentam variações significativas na mortalidade, quando inoculados por via intracraniana com uma dose letal do vírus. No entanto, quando inoculados por via intraperitoneal, os animais com 21 dias apresentam uma maior variação em relação a susceptibilidade ao vírus, sendo que os animais com 3 semanas foram resistentes a infecção letal (TRENT *et al*, 1980).

O'LEARY *et al* (1941), também discutem que a maior mudança na susceptibilidade dos camundongos ao SLEV ocorre entre a segunda e a terceira semana de vida. Neste estudo, os animais foram inoculados por via intraperitoneal com a linhagem epidêmica *Hubbard* (1937), sendo que os animais com 2 semanas de idade foram mais susceptíveis ao vírus quando inoculados por esta via.

Para avaliar a persistência do SLEV no Sistema Nervoso Central (SNC), SLAVIM (1942), infectou camundongos nascidos de fêmeas imunizadas previamente com o SLEV. Os camundongos foram infectados com 2 semanas de idade, por via intranasal, e sacrificados durante diferentes intervalos de tempo. Os sobrenadantes de cérebros e medula espinhal de 14 grupos (n=2) de animais infectados foram utilizados para a infecção intracraniana de 6 a 15 animais. Destes, 3 grupos (71, 106 e 162 d.p.i) foram capazes de produzir sinais de encefalomielite nos animais, uma segunda passagem do cérebro destes animais foi feita em animais não imunes e em animais que receberam a imunização previa. Após a segunda passagem, os animais não imunizados morrem entre 4 e 5 d.p.i. Este estudo confirmou a latência da infecção do SNC pelo SLEV em roedores, e o índice que outros animais, como pequenos mamíferos, poderiam atuar como reservatórios do SLEV. Outros estudos também já demonstraram a imunidade de camundongos após a infecção subcutânea com o SLEV (LESLIE & WEBSTER, 1938).

2. JUSTIFICATIVA

A Encefalite Viral de *Saint Louis* é uma doença infecciosa febril aguda causada pelo vírus *Saint Louis Encephalitis vírus* (SLEV), algumas espécies de aves participam do ciclo de transmissão como reservatórios e humanos e outros mamíferos são hospedeiros acidentais do vírus. A infecção humana com vírus SLEV pode resultar em doença clínica, sendo que o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de doença sintomática grave, como a encefalite, é a idade. A doença é endêmica nos Estados Unidos, e apesar do isolamento do SLEV em seres humanos não ser frequente no Brasil, que pode ser resultado de diagnósticos laboratoriais inadequados, a detecção sorológica do SLEV em aves e mamíferos de diversas regiões do país já foi relatada, e as condições climáticas brasileiras, adequadas para a ocorrência de zoonoses causadas por arbovírus, podem favorecer a sua disseminação. Portanto, por ser uma doença de magnitude desconhecida no país, com padrão epidemiológico ainda não definido, após os casos ocorridos em São José do Rio Preto, SP, em 2006, o Ministério da Saúde estabeleceu-se a notificação compulsória desta doença nesta região, e os casos que preenchem a definição de caso suspeito devem ser notificados ao serviço de vigilância epidemiológica local.

Assim como outras viroses, não existe tratamento específico para a doença, até o momento nenhum fármaco antiviral está disponível para uso clínico. Vacinas estão disponíveis apenas para outros membros da família *Flaviviridae*, como o YFV, o JEV e o TBEV, sendo que a vacina contra o DENV começa a ser utilizada embora sua real eficácia deva ser aguardada. A importância de diversos flavivírus como agentes causadores de infecções graves em seres humanos, que acarretam problemas globais de saúde pública, demonstra a necessidade de se desenvolver fármacos anti-Flavivirais, evitando assim, a sua emergência as graves consequências destas epidemias.

O desenvolvimento de fármacos antivirais consiste usualmente na busca de inibidores de proteínas virais essenciais à multiplicação viral. No entanto, uma

nova abordagem têm se mostrado bastante promissora, com atividade antiviral contra os membros do gênero *Flavivirus*, e consiste na busca de proteínas celulares como alvos terapêuticos, com a utilização de inibidores farmacológicos das funções celulares requeridas pelos vírus durante seu ciclo de multiplicação (BONJARDIM, 2017). Dentre as funções celulares, estão as tirosinas cinases e vias sinalizadoras que participam de regulação de virtualmente todos os processos celulares (proliferação, crescimento, sobrevivência/apoptose e defesas antivirais inatas). Inibidores destas proteínas cinases estão disponíveis e sua ação antiviral tem sido confirmada em diversos trabalhos.

Experiência acumulada do GTS utilizando uma abordagem de reposição de fármacos liberados para uso humano, ou que estejam em testes clínicos fase II ou III para o tratamento de doenças crônicas e suas utilizações como potenciais antivirais, nos motiva a prospecção de novos potenciais antivirais. Assim, inibidores de MEK/ERK se mostraram com ação anti-YFV (ALBARNAZ et al., 2014), anti-DENV-2 e -3, estes com comprovada ação antiviral *in vivo* (Ribeiro, 2015; em preparação), e anti-Zika (VALÊNCIA/OLIVEIRA /BONJARDIM), não publicado.

Diante destas circunstâncias, este projeto propõe a avaliação de uma potencial atividade antiviral de inibidores farmacológicos de tirosinas cinases da família de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e das vias sinalizadoras celulares de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) durante a infecção pelo SLEV, com estudos realizados tanto *in vitro*, quanto *in vivo*,

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito da utilização *in vitro* de inibidores farmacológicos (IFs) de tirosinas cinases da família de Src (SFKs) e da via sinalizadora celular MEK/ERK1/2 (MAPK), sobre o ciclo de multiplicação do SLEV, e também o potencial uso destes IFs como antivirais em modelo murino de infecção.

3.2 Objetivos específicos:

1. Analisar a cinética de fosforilação *in vitro* das MAPKs, ERK1/2 e das SFKs, em resposta à infecção pelo SLEV.
2. Analisar, *in vitro*, o efeito dos inibidores para as vias MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2), e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2), sobre o título viral após infecção de células BHK-21.
3. Verificar, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, o efeito do tratamento com os IFs de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2); e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2), sobre a morfogênese e/ou disseminação do SLEV.
4. Analisar, *in vivo*, o efeito dos inibidores específicos da via de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1) e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2) após infecção de camundongos Balb/C com o SLEV.
5. Determinar o efeito dos inibidores de MEK/ERK (MEK/ERK-1) e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2) sobre o título viral do SLEV após a infecção dos camundongos por meio de RT-qPCR do cérebro e baço.

6. Avaliar o efeito dos inibidores de MEK/ERK (MEK/ERK-1) e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2) sobre a curva de sobrevivência dos camundongos após a infecção com o SLEV.

7. Avaliar possíveis alterações histológicas no cérebro, baço e intestino dos camundongos Balb/C após infecção com SLEV, tratados ou não com os IFs citados acima.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

4.1.1 Células C6/36

As células C6/36 são células de linhagem contínua de larvas de mosquito *Aedes albopictus*. Essas células foram mantidas em meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Invitrogen) suplementado com 5% Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas), L-Glutamina 200mM (Invitrogen), antibióticos (Gentamicina 40µg/ml e Penicilina 200 U/ml) e antifúngico (Fungizona 1,5µg/ml), a 28° C. Estas células foram utilizadas na produção do estoque viral de DENV-3 e do SLEV.

4.1.2 Células BHK-21

As células BHK-21 são fibroblastos de linhagem contínua derivados de rim de hamster neonato. A linhagem foi obtida originalmente a partir da ATCC (BHK [C-13], CCL-10), sendo mantida em meio mínimo essencial modificado por Dulbecco – DMEM (Cultilab), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), com antibióticos (gentamicina 40 µg/mL e penicilina 200 U/ml) e com antifúngico (Fungizona 1,5µg/ml), sendo mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%. Foram utilizadas para os experimentos *in vitro* e para a titulação de DENV e SLEV.

4.2 Vírus

4.2.1 DENV-3

O vírus da Dengue (DENV-3), genótipo I (MG-20/2004), foi isolado a partir do soro de paciente com Dengue Hemorrágica, sendo obtido na Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Células C6/36 foram implantadas em garrafas de 150 cm² (densidade inicial de 2 x 10⁶ células por

garrafa) contendo meio L-15. Após atingirem 80% de confluência, as células foram infectadas com DENV-3, a (M.O.I) = 0,01 seguido de incubação até que se observasse o efeito citopático. Após esse período o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, em centrífuga (Eppendorf 5430R, rotor FA-45-30-11), para sedimentação de resíduos celulares. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e armazenado em freezer a -80°C.

4.2.2 SLEV

O vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) utilizado experimentalmente foi a amostra de referência SLEV BeH 355964, a qual foi gentilmente doada pelo Dr. Maurício L. Nogueira, do Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, Brasil. A amostra foi inoculada em células C6/36 para a produção dos estoques virais, seguindo-se protocolos similares aos utilizados para a produção dos estoques do DENV-3 citado anteriormente.

4.2.3 Titulação Viral

Para as titulações virais, foram realizadas diluições seriadas na razão de 10 da suspensão viral (10^{-1} a 10^{-5}), sendo posteriormente, inoculadas em monocamadas de células BHK-21 implantadas em placas de 6 poços com confluência entre 90% (aproximadamente 8×10^5 células por poço), sendo um poço não infectado mantido para controle celular. Após uma hora de adsorção com o vírus, foram adicionados 2 mL de meio 199 (cultilab), suplementado com 2% SFB e contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC; Synth). As placas foram, então, incubadas a 37°C (CO₂ a 5%) por até 96 horas. Durante esse período, foi realizado o acompanhamento por microscópio invertido para análise do efeito citopático sobre a monocamada, que foram fixadas com 2 mL de solução de formalina a 10% por 1 h e coradas com solução contendo 1% (p/v) de cristal violeta em PBS para contagem das placas de lise. O título viral

foi expresso através do número de unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL).

4.3 Inibidores farmacológicos e anticorpos

Foram utilizados inibidores farmacológicos de proteínas cinases componentes de vias sinalizadoras celulares, tais como: MEK – IF-MEK/ERK2 (Cell Signaling Technology, USA); IF-MEK/ERK-1, e de tirosinas cinases: Src/Abl – IF-Src-1; IF-Src-2 (Selleck Chemicals, USA). Os inibidores foram diluídos de acordo com as recomendações do fabricante, em condições ótimas para a inibição específica de seus respectivos alvos, sem causar efeitos tóxicos às células. Foram utilizados neste trabalho os anticorpos fosfo-específicos Anti-Src (pY⁴¹⁸) (Invitrogen), Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling) e anti-β-actina (Sigma-Aldrich).

4.4 Teste da viabilidade celular

Para testar a viabilidade da linhagem celular BHK-21 frente aos distintos inibidores farmacológicos, foram realizados ensaios de MTT e ensaios com azul de tripan. Para a realização do MTT, as células foram implantadas em placas de 96 poços (1 x 10⁴ células por poço) utilizando as condições de crescimento já descritas anteriormente. Os inibidores foram diluídos, em concentrações que variavam de 40µM a 0,625µM, e adicionados às células, após estas atingirem aproximadamente 95% de confluência. Após 48 horas de incubação, o experimento foi revelado utilizando-se o reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltertrazólio) diluído em PBS, sendo a leitura efetuada em leitor de ELISA (570 nm). Para os controles foi utilizado DMSO em diferentes concentrações, equivalente a dos inibidores. Juntamente com a análise de viabilidade celular, foi realizada uma análise morfológica, ao longo dos tratamentos com os inibidores, por meio de microscopia de campo claro. Para a avaliação da viabilidade celular com azul de tripan, as células foram implantadas em placas de 6 poços (8 x 10⁵ células por poço) e tratadas com as seguintes concentrações dos IFs, 10 µM (IF-Src-1), 2.5 µM (IF-Src-2) e o controle com 10 µM (DMSO) pelos tempos de 24 e 48 horas, em triplicata.

Neste ensaio, as células aderidas, assim como, o sobrenadante de cada poço foram utilizados para a contagem das células viáveis e não viáveis. As células presentes no sobrenadante foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm em centrífuga (Eppendorf 5430R, rotor FA-45-30-11) por 5 minutos e as células aderidas foram tripsinizadas. O pellet celular e as células tripsinizadas foram ressuspensas em PBS e alíquotas de 10 µl foram acrescidas de 10 µl de azul de tripan e incubadas por 10 minutos antes da contagem das células em câmara de Neubauer.

4.5 Ensaio Virucida

Este ensaio foi realizado para verificar se a atividade antiviral dos IFs é consequência da ação direta destes sobre a partícula viral, ou seja, se eles exercem uma atividade virucida. Para a realização do ensaio, 0.5mL de alíquotas do SLEV (título $3,5 \times 10^6$ PFU/ml) foram incubadas com 0.5mL de uma solução de meio DMEM preparada a 20 µM (IF-Src-1), 5 µM (IF-Src-2) ou com mesmo volume utilizado de DMSO, em banho-maria 37°C por 1 hora. Após a incubação, as alíquotas foram imediatamente tituladas em células BHK-21 conforme descrito no item 4.2.3. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6 Ensaio Dose Resposta

Para cada inibidor, foram realizados ensaios de dose resposta para a definição das concentrações de uso capazes de promover a redução de no mínimo uma unidade logarítmica dos títulos virais. Nestes ensaios, foram feitas diferentes diluições dos inibidores, determinadas a partir das maiores concentrações em que não foram observados efeitos citotóxicos. Células BHK-21 foram implantadas em placas de 24 poços e no dia seguinte, com aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por poço, foram pré-tratadas com os IFs IF-Src-1 (10, 20 µM), IF-Src-2 (1.25, 2.5, 5µM), IF-MEK/ERK-1 (10, 20 e 40µM) ou IF-MEK/ERK-2 (3.75, 7.5, 15µM) por 30 minutos. Após o pré-tratamento, as monocamadas foram então infectadas com o DENV-3 ou SLEV, a uma MOI= 1,0 ou 0,01. Após 1 hora de adsorção com o vírus, as monocamadas foram lavadas duas

vezes com PBS e foi adicionado 1 mL por poço de meio preparado com diferentes concentrações de cada inibidor, mantidos durante todo o período pós-infecção. As placas foram incubadas a 37⁰C (CO₂ a 5%). O experimento foi realizado em triplicata e os controles de vírus não tratados para ambos os vírus foram feitos com concentrações equivalentes de DMSO. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 36 e 48 horas pós-infecção (h.p.i) e titulados conforme descrito no item 4.2.3.

4.7 Curva de multiplicação viral

Para a análise da potencial atividade antiviral dos inibidores, a qual podem afetar diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral, foram realizadas curvas de multiplicação viral na presença e na ausência dos inibidores, após diferentes tempos de infecção e variando-se a M.O.I. Assim, infecções utilizando-se MOI = 1 ou M.O.I = 0,01, foram utilizadas, respectivamente, para avaliar se o efeito da inibição estaria afetando etapas precoces do ciclo multiplicativo (morfogênese) ou se afetaria etapas tardias (disseminação). Para isso, células BHK-21 foram implantadas em placas de 24 poços e no dia seguinte, com aproximadamente 1,5 x 10⁵ células por poço, as células foram pré-tratadas com os IFs IF-Src-1 (10 µM), IF-Src-2 (2.5 µM) ou IF-MEK/ERK-1 (20µM) por 30 minutos. Após o pré-tratamento, as monocamadas foram então infectadas com o SLEV a uma MOI= 1,0 ou 0,01. Após 1 hora de adsorção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado 1 mL de meio por poço preparado com as concentrações citadas anteriormente de cada inibidor, mantidos durante todo o período pós-infecção. As placas foram incubadas a 37⁰C (CO₂ a 5%). O experimento foi realizado em triplicata e o controle não tratado do vírus foi feito com concentrações equivalentes de DMSO. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos de 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h.p.i (MOI de 1 e 0,01) e titulados conforme descrito no item 4.2.3.

4.8 Extração de proteínas totais

Para o preparo dos extratos de proteínas totais, as células foram coletadas após infecção com SLEV a MOI = 1, pelos tempos indicados em cada

experimento. As células foram, então, lavadas duas vezes com PBS e armazenadas em congelador -20°C. Para a extração, as células foram incubadas em gelo por 20 minutos acrescidas de 100µL/poço de solução de lise [Triton X-100 1%; Tris-HCl 100mM pH 8,0; EDTA 0,2mM; glicerol 20% (v/v); NaCl 200mM; NaVO₃ (ortovanadato de sódio) 1mM; NaF (fluoreto de sódio) 50mM; PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 1mM; aprotinina 5µg/mL; leupeptina 2,5µg/mL; DTT (ditiotretitol) 1mM]. Após a incubação, o lisado foi coletado e clarificado, para remoção dos restos celulares, através de centrifugação a 13.000 rpm em centrífuga (Eppendorf 5430R, rotor FA-45-30-11), por 20 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad Laboratories). As proteínas foram alíquotadas e armazenadas a -20°C.

4.9 Transferência de “Western”

A técnica foi utilizada para a confirmação da indução/inibição da fosforilação das cinases de Src ou Erk1/2, após infecção com o SLEV. Para a realização do ensaio, alíquotas (10-25µg) das amostras proteicas foram acrescidas de tampão LB (“Laemmli buffer”) 1x [Tris-HCl 0,5M pH 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 20% (p/v)] e desnaturadas por 5 minutos a 99°C. As amostras foram submetidas a fracionamento em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare), conforme protocolo do kit Bio-Rad Transference (Bio-Rad Laboratories). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 1% para a verificação da eficiência da mesma, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas utilizadas. A seguir, as membranas foram bloqueadas em solução de albumina sérica bovina (BSA) ou leite em pó a 5% (p/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) diluídos em Tampão Salina Tris (TBS). Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-Tween a 0,1% e incubadas com o anticorpo primário desejado por 24 horas a 4°C, preparado em solução

de BSA a 5% (p/v) diluído em TBS/Tween. As membranas foram novamente lavadas três vezes em TBS/Tween e incubadas, por 1 hora a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, preparado em solução de leite em pó a 5% (p/v) diluído em TBS/Tween. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas em TBS/Tween, e incubadas em solução reveladora Luminata Western Chemiluminescent HRP Substrates (Merck Millipore) pelo tempo recomendado pelo fabricante, expostas contra filme Hyperfilm ECL (GE Healthcare) e reveladas com revelador e fixador (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a avaliação do eventual efeito do tratamento com os inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) sobre o ciclo de multiplicação do SLEV por meio de microscopia eletrônica de transmissão, células BHK-21 (2×10^6) foram implantadas em garrafas de cultivo (150cm^2) e no dia seguinte, com aproximadamente 80-90% de confluência, foram tratadas com os IFs IF-Src-1 ($10\mu\text{M}$), IF-Src-2 ($2.5\mu\text{M}$), IF-MEK/ERK-1 ($20\mu\text{M}$) ou IF-MEK/ERK-2 ($15\mu\text{M}$) por 30 minutos. Após o pré-tratamento, as monocamadas foram então infectadas com o SLEV a uma MOI= 1,0. Após 1 hora de adsorção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 20 mL de meio por garrafa, preparado com as concentrações citadas anteriormente de cada inibidor e mantidos durante todo o período pós-infecção. As garrafas foram incubadas a 37°C (CO_2 a 5%) por 36 horas. O controle não tratado do vírus foi feito com concentrações equivalentes de DMSO. Após 36 horas, o sobrenadante foi descartado e a monocamada celular foi removida mecanicamente (rodinho), coletada em tubo falcon de 50ml e centrifugada a 1000 rpm em centrífuga (Eppendorf 5430R, rotor FA-45-30-11), por 10 minutos. O pellet celular foi ressuspensão em 5mL de solução fosfato 0,1M e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, o pellet foi ressuspensão e centrifugado novamente. Posteriormente, foram adicionados 2mL de solução fixadora (Glutaraldeído 2,5%, tampão fosfato 0,1M) ao pellet celular, que foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente, sendo agitado a cada 15 minutos,

seguido de centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos. Os pellets de cada amostra foram ressuspensos em solução fosfato 0,1M, centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos, e armazenados a 4°C. As amostras foram encaminhadas ao centro de microscopia da UFMG onde foram processadas para posterior análise no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV.

4.11 Avaliação do potencial efeito antiviral dos IFs em modelo animal

4.11.1 Modelo animal e delineamento experimental

Experimentos foram realizados para a avaliação do possível efeito antiviral dos inibidores de Src e MEK/ERK “*in vivo*”, cujo detalhamento experimental está indicado na tabela 3 abaixo. Foram avaliados: Dose Letal 50 (A), ensaio de tolerabilidade aos IFs (B), quantificação Viral (RT-PCR) e histologia (C), curva de sobrevivência e SHIRPA (D). Em todos os experimentos foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C, fêmeas, com idade entre 17 a 19 dias, fornecidas pelo Biotério Central da UFMG. Os experimentos foram realizados no biotério do Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG) e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 94/2016). Em todos os experimentos, os animais foram agrupados homogeneamente em relação ao peso e idade e pesados diariamente, aqueles que perderam 25% de seu peso inicial após a infecção foram eutanasiados. Os animais utilizados foram humanamente eutanasiados ao final dos experimentos, com sedação seguida de deslocamento cervical.

Tabela 3 – Delineamento experimentos “in vivo”

A – Estudo de DL50

Grupos (n=5)

G2

Inóculo

SLEV 10 UFP

G3	SLEV 10 ³ UFP
G4	SLEV 10 ⁵ UFP

B - Ensaio de Tolerabilidade aos IFs

Grupos (n=2)	Inóculo	Tratamento	Período
G1	Sobrenadante C6/36	IF-Src-2 (150mg/Kg/dia)	8 dias
G2	Sobrenadante C6/36	IF-Src-1 (25mg/Kg/dia)	8 dias
G3	Sobrenadante C6/36	IF-MEK/ERK-1 (100mg/Kg/dia)	8 dias
G4	Sobrenadante C6/36	Veiculo	8 dias

C - Quantificação Viral (RT-PCR) e Histologia

Grupos	Infecção SLEV	Tratamento	Eutanásia		
Somente RT-PCR (n=4)	G1	SLEV 10 ⁴ UFP	IF-Src-2 (150mg/Kg/dia)	7 dias	
	G2	SLEV 10 ⁴ UFP	IF-Src-1 (25mg/Kg/dia)	7 dias	
	RT-PCR (n=4) e Histologia (n=3)	G3	SLEV 10 ⁴ UFP	IF-MEK/ERK-1 (100mg/Kg/dia)	7 dias
		G4	SLEV 10 ⁴ UFP	Veiculo	7 dias
Somente Histologia (n=3)	G5	Sobrenadante C6/36	IF-Src-1 (25mg/Kg/dia)	7 dias	
	G6	Sobrenadante C6/36	IF-MEK/ERK-1 (100mg/Kg/dia)	7 dias	
	G7	Sobrenadante C6/36	Veiculo	7 dias	

D - Curva de Sobrevivência e SHIRPA

Grupos	Infecção SLEV	Tratamento	Período	
Sobrevivência e SHIRPA (n=12 ou 5)	G1	10 ⁴ ou 10 ³ UFP	IF-Src-1 (25mg/Kg/dia)	7 dias
	G2	10 ⁴ ou 10 ³ UFP	IF-MEK/ERK-1 (100mg/Kg/dia)	7 dias
	G3	10 ⁴ ou 10 ³ UFP	Veiculo	7 dias
Controle SHIRPA	G4	Sobrenadante C6/36	-	-

4.11.2 Estudo da Dose-Letal 50 (DL50)

De acordo com as recomendações do CEUA, com o objetivo de utilizar o menor número possível de animais, a determinação da DL50 foi realizada baseada em adaptações dos métodos de toxicidade aguda por via oral, com estudos dose a dose (OECD TG 420 – Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas). Neste teste, grupos de animais, de um único sexo, são tratadas em um procedimento passo a passo utilizando doses fixas do composto químico a ser testado, no caso do estudo, foram utilizadas doses fixas do inóculo viral. A dose inicial deve ser determinada como a dose esperada que resulte em alguns sinais clínicos de toxicidade, sem causar efeitos tóxicos graves ou mortalidade nos animais. Posteriormente, grupos de animais podem ser testados com doses fixas maiores ou menores dependendo da presença ou ausência de sinais de toxicidade ou mortalidade (mortalidade ≥ 2 , mortalidade ≥ 1 ou < 1 , sem mortalidade), até que seja identificada a dose que provoca uma toxicidade/mortalidade evidente, ou se não forem observados efeitos nas doses mais elevadas ou quando forem observadas mortes nas doses mais baixas (OECD Test Guideline 420, 2001). Os procedimentos de avaliação de toxicidade aguda (OECD TG 420 “doses fixas”, 425 “up and down”, 423 “classe tóxica aguda”) são basicamente um estudo de DL50, no entanto, o objetivo não é determinar um valor DL50 específico, mas sim determinar um espectro de valores de exposição ao agente no qual a letalidade seja esperada, já que a morte de uma proporção dos animais determina o fim deste teste (“toxic endpoint”).

Com base no resultado do teste, foi determinado um valor para o inóculo viral dentro do espectro de letalidade observado e este inóculo foi utilizado em todos os experimentos com os IFs para a comparação dos grupos tratados e não tratados. Para o estudo da DL50, foram realizadas diluições seriadas na razão de 10 (10^{-1} a 10^{-5}) (a partir do estoque viral ajustado para 1×10^7 UFP/SLEV). Um grupo de 5 animais, fêmeas, foi inicialmente infectado por via intraperitoneal (i.p.) com 100 μ L da diluição de 10^{-5} (aproximadamente 10 UFP/animal), e após 7 dias, conforme o resultado do número de óbitos deste

grupo (mortalidade ≥ 2 , ≥ 1 ou < 1 , sem mortalidade), um novo grupo de 5 animais foi infectado com 100 μL da diluição 10^{-3} ($\sim 10^3$ UFP/animal), novamente, conforme o resultado do número de óbitos do último grupo, um novo grupo foi infectado com 100 μL da diluição 10^{-1} ($\sim 10^5$ UFP/animal do SLEV). Por se tratarem de animais jovens, com idades entre 17 e 19 dias, para confirmar que os procedimentos realizados (infecção i.p. e gavagem) não ocasionariam danos aos animais e que o óbito estaria relacionado somente à infecção, todos os animais foram inoculados com PBS por via oral (gavagem), uma vez ao dia, durante o experimento. Os grupos avaliados foram divididos conforme a tabela 3^a (pág. 46).

4.11.3 Ensaio de Tolerabilidade

Os IFs foram administrados nas concentrações indicadas pelo fabricante para uso em animais, sendo 25mg/Kg/dia (IF-Src-1), 100mg/kg/dia (IF-MEK/ERK-1) e 150mg/Kg/dia (IF-Src-2) (<http://www.selleckchem.com>). Os grupos avaliados foram divididos conforme a tabela 3B (pág. 47). Os IFs foram diluídos em solução de 0,5% de carboximetilcelulose sódica (CMC-SA-Synth) e 0,4% de Tween 20 (Sigma). Para a avaliação de possíveis efeitos adversos nas concentrações utilizadas, cada IF foi administrado em grupos de 2 animais durante 8 dias. Antes da administração dos fármacos, os animais foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com 100 μL do sobrenadante de células C6/36 não infectadas. Os IFs foram administrados por via oral (gavagem), com 2 doses diárias, com intervalo de 12 horas, durante 8 dias. Os animais foram observados e pesados durante 15 dias, para a avaliação das curvas de peso.

4.11.4 Quantificação viral após o tratamento com os inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK1)

Para a quantificação viral após o tratamento com os IFs, grupos de 4 animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com 100 μL da diluição 10^{-2} do estoque viral do SLEV ($\sim 10^4$ UFP/animal). O tratamento com os IFs foi iniciado 12 h.p.i, sendo administrados duas vezes ao dia, durante 7 dias. Os grupos

avaliados foram divididos conforme a tabela 3C (pág. 47). Durante o experimento, os animais foram pesados diariamente e observados para avaliação dos sinais clínicos da infecção. Ao final do experimento, animais foram eutanasiados e os órgãos (cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, plexo mesentérico) e sangue foram coletados. O sangue foi coletado através do plexo braquial e, posteriormente, foi centrifugado a 3000 rpm em centrífuga (Eppendorf 5430R, rotor FA-45-30-11), por 5 minutos. Os soros foram transferidos para microtubos e armazenados em freezer a -80°C.

4.11.5 Extração do RNA total do cérebro e baço e transcrição reversa

Para a obtenção do RNA total, os órgãos foram pesados e macerados com 1mL de meio DMEM em Mini Bead-beater-16 (BioSpec). Após a maceração, os órgãos foram centrifugados em microcentrifuga a 11400 rpm em centrífuga (Eppendorf 5430R, rotor FA-45-30-11), por 10 minutos, sendo 300µL do sobrenadante utilizados para a extração de RNA com o reagente Trizol (Invitrogen). Foram adicionados 1mL de Trizol em cada amostra e o lisado foi homogeneizado com o auxílio da pipeta e mantido por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, 200µL de clorofórmio foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram vortexados e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 11400 rpm por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida para um novo tubo de 1,5mL. O RNA foi precipitado com 500µL de isopropanol. Os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida, centrifugados a 11400 rpm por 10 minutos a 4°C. Os precipitados de RNA foram lavados com 1mL de etanol a 75%. Os tubos foram vortexados e centrifugados a 8900 rpm por 5 minutos a 4°C. Os precipitados de RNA foram secos, ressuspensos em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e quantificados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Para a síntese do cDNA (DNA complementar), 2µg de RNA, 0,5µg de oligonucleotídeo dT e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 15µL foram desnaturados a 70°C por 5 minutos, e em seguida, adicionados a reação contendo tampão da transcriptase reversa (Tris-HCl pH 8,3 50mM; KCl 75mM; MgCl₂ 3mM; DTT 10mM), dNTP (deoxirribonucleotídeo trifosfato)

500µM, 200U de transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina Moloney) (Promega) e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 25µL. A reação de transcrição reversa foi realizada por 1h a 42°C.

4.11.6 PCR quantitativa em tempo Real (RT-qPCR)

O PCR em tempo real foi realizado em equipamento StepONE Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os níveis de amplificação do cDNA-SLEV foram normalizados em relação aos níveis de cDNA do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH. E as quantidades relativas de cDNA-SLEV nos animais tratado com os IFs (IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK/ERK-1) foram comparadas em relação as quantidades detectadas nos animais tratados com o veículo. As normalizações foram realizadas pelo método de calibração de eficiência (Paffl, 2001).

Cálculo utilizado - método Paffl /Calibração de Eficiência

$$\text{Razão} = E (\text{alvo/SLEV})^{[\Delta CT, \text{alvo (controle-amostra)}]} / E (\text{referencia/GAPDH})^{[\Delta CT, \text{referencia (controle-amostra)}]}$$

A reação foi preparada com 5µL de Go-Taq Green master mix (Promega), 0,2µM de cada iniciador (*forward* e reverso), 1µL de cDNA e água deionizada q.s.p. 10µL. As sequencias dos iniciadores utilizados são demonstrados na tabela 4. As condições de reação foram: desnaturação inicial de 10min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C.

Tabela 4 - Iniciadores Utilizados

	Foward	Reverse
SLEV		
GAPDH	5'CCAGCCTCGTCCCGTAGA3'	5'CGCCCAATACGGCCAAA3'

4.11.7 Curva de sobrevivência frente ao tratamento com os inibidores de Src (IF-Src-1) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1)

Para a determinação da curva de sobrevivência os animais foram divididos em grupos de 12 animais e infectados por via i.p. com 100µL da suspensão viral do SLEV (10^4 UFP/animal). O tratamento com os IFs foi iniciado 12 h.p.i, sendo administrados duas vezes ao dia, durante 7 dias. Os grupos avaliados foram divididos conforme a tabela 3D (pág 47). Os animais foram pesados e observados diariamente para avaliação dos sinais clínicos da infecção e para a caracterização da curva de sobrevivência. O experimento foi repetido para a confirmação dos resultados com um grupo de 5 animais, onde os animais foram infectados com um inoculo menor do SLEV ($\sim 1 \times 10^3$ UFP/animal). Os animais foram tratados com os IFs nas mesmas condições e concentrações anteriormente citadas (tabela 3D). Neste experimento, os animais também foram pesados e observados diariamente, sendo que também foi realizado o teste SHIRPA em todos os animais.

4.11.8 Teste SHIRPA

Para avaliar aspectos comportamentais e neurológicos após a infecção com o SLEV e os tratamentos com os IFs, foi realizado a bateria de testes SHIRPA (sigla que significa SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment). O SHIRPA consiste em uma bateria de testes simples e sistematicamente validados, que oferecem uma escala de observações abrangendo aspectos neurológicos, motores, sensoriais e comportamentais dos animais (BROOKS & DUNNETT, 2009). O teste foi realizado em 5 animais por grupo, conforme descrito na tabela 3D (pág. 47), no 1º, 3º, 5º, 6º, 7º e 8º dia após a infecção. Durante o experimento, os animais são pesados e avaliados em cinco categorias descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Teste SHIRPA

Parâmetros observados	
Função reflexa e sensorial	Posicionamento visual, pinna reflex, reflexo corneal, beliscada da pata traseira, reflexo postural.
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, mordida provocada, medo, irritabilidade, agressão e vocalização.
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, ambulação, elevação da cauda, encurvamento do tronco, segurar as patas traseiras, manobra do arame, geotaxis negativa.
Função autônoma	Taxa de respiração, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, cor da pele, frequência cardíaca, lacrimejação, salivação.
Tônus muscular e força	Força ao agarrar, tônus corporal, tônus dos membros e tônus abdominal.

4.11.9 Histologia órgãos

Para a histologia, amostras de tecidos do cérebro, baço e intestino delgado de animais infectados e tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1) ou tratados somente com o veículo foram coletadas. Os grupos foram divididos conforme a tabela 3C (pág 47). Para o processamento, as amostras de tecidos foram fixadas em Formalina Tamponada de Carson (Formaldeído 100mL, Fosfato de sódio monobásico 18,6g, Hidróxido de sódio 4,2g, água destilada q.s.p 1000mL, pH 7,2-7,4). Após a fixação, o material foi desidratado com três banhos graduais em álcool (70°, 80° e 95°) e três banhos em álcool absoluto. Posteriormente, os tecidos foram clarificados com três banhos em solução de Xilol. A impregnação do material foi feita com três banhos em parafina (60°C), seguida da inclusão em parafina. Os tecidos foram cortados em micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (H & E).

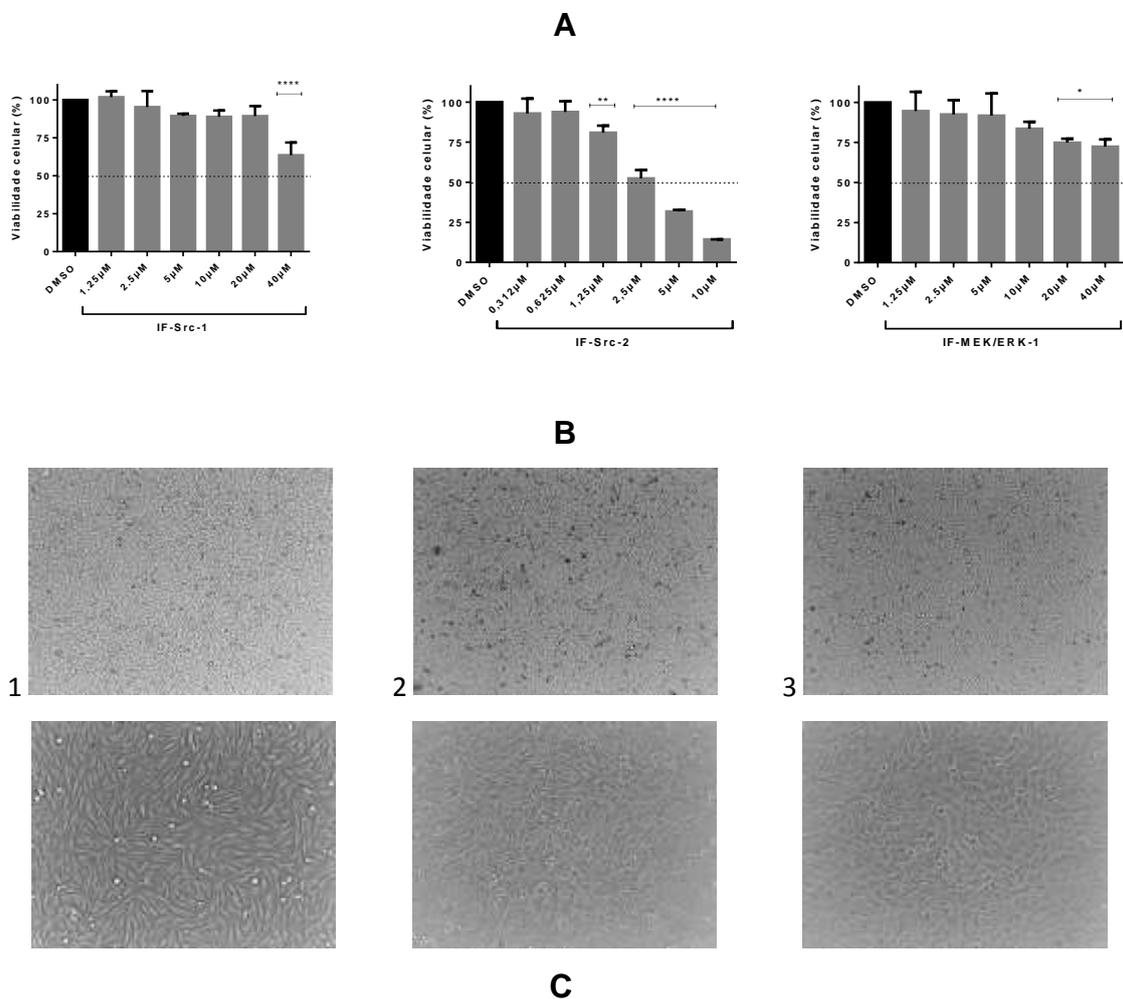
5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular após o tratamento com os inibidores Farmacológicos (IFs).

Foi realizado um ensaio de MTT para avaliar a viabilidade da linhagem celular BHK-21 frente ao tratamento com diversas concentrações dos inibidores farmacológicos IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK-ERK-1. O MTT é um ensaio colorimétrico que mede a atividade da redutase mitocondrial em células vivas. Ele se baseia na clivagem do sal amarelo tetrazólio (permeável à membrana celular) em cristais de formazan azuis/púrpura por células metabolicamente ativas, a quantidade de formazan gerada, medida por espectrofotometria, é proporcional ao número de células viáveis. Este ensaio é utilizado para quantificar o crescimento e a viabilidade celular, podendo ser utilizado também como um indicador de citotoxicidade. Juntamente com a análise espectrofotométrica, foi realizada também uma análise morfológica, por meio de microscopia de campo claro, já que estes fármacos são inibidores de cinases celulares diretamente envolvidas em processos de proliferação celular. Portanto, nestes casos, uma redução da quantidade de formazan gerada pode estar relacionada não somente a efeitos citotóxicos, mas também a uma redução no metabolismo celular.

A partir deste ensaio, foram escolhidas as maiores concentrações em que não foram observados efeitos citotóxicos para a realização dos ensaios de dose resposta. Durante a análise morfológica das células em microscópio ótico, nos tempos de 24 e 48 horas, nenhuma das concentrações apresentou efeitos citotóxicos, com exceção da concentração de 10 μ M para o IF-Src-2. No entanto, no ensaio de MTT foi observada uma redução na viabilidade celular proporcional ao aumento das concentrações dos inibidores, quando comparadas ao controle celular com DMSO (figura12A).

Foi realizado também um ensaio com Azul de Tripán para confirmar a viabilidade observada no ensaio de MTT com os IFs. Células BHK-21 foram tratadas com as concentrações escolhidas dos IFs IF-Src-1 (10µM) e IF-Src-2 (2.5µM) pelos tempos de 24 e 48h e coradas com Azul de Tripán. As células coradas (não viáveis) e não coradas (viáveis) foram contadas em câmara de Neubauer. Na Figura 12C, podemos observar que ambos os IFs inibem o crescimento celular, mas que esta inibição não está relacionada a um aumento na citotoxicidade já que o número de células não viáveis é o mesmo ou menor comparado ao controle tratado com DMSO.



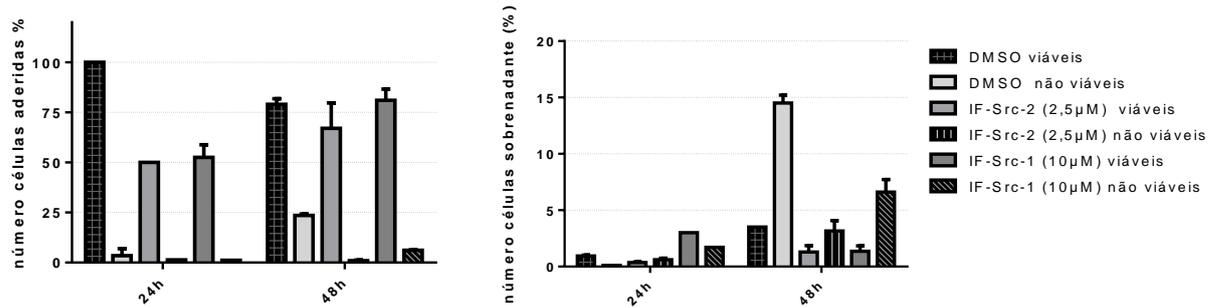


Figura 12: Ensaio de viabilidade celular. A- O MTT foi realizado para avaliar a viabilidade da linhagem celular BHK-21 após o tratamento com os inibidores IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK/ERK-1 B – Fotos de células BHK-21 tratadas com os IFs durante 24 horas: 1 – Controle DMSO; 2- IF-Src-1 (10µM); IF-Src-2 (2.5µM). C – Ensaio com Azul de Tripán, células BHK-21 foram tratadas com os IFs IF-Src-1 (10µM) e IF-Src-2 (2.5µM) durante os tempos de 24 e 48 horas, conforme indicado à direita das figuras. As células foram coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer.

5.2 Ensaio Virucida

Foi realizado um ensaio para avaliar se o potencial efeito antiviral observado após o tratamento com os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 estaria relacionado à sua ação sobre a família de fosfotirosinas Src ou seria resultado de sua ação direta sobre a partícula viral. É possível observar que o tratamento não interfere com a viabilidade da partícula viral, pois, a incubação do vírus somente com os inibidores não apresentou nenhum efeito capaz de afetar a multiplicação do SLEV em células BHK-21. Após a titulação, os vírus incubados com os inibidores apresentaram o mesmo título comparado ao controle viral com DMSO (figura 13). Portanto, o efeito na redução dos títulos de SLEV observado nos ensaios de dose-resposta e nas curvas de multiplicação não deve estar relacionado a uma ação direta destes fármacos sobre o vírus, mas provavelmente, devem afetar alguma(s) cinases celulares que podem ser necessárias durante alguma etapa do seu ciclo de multiplicação.

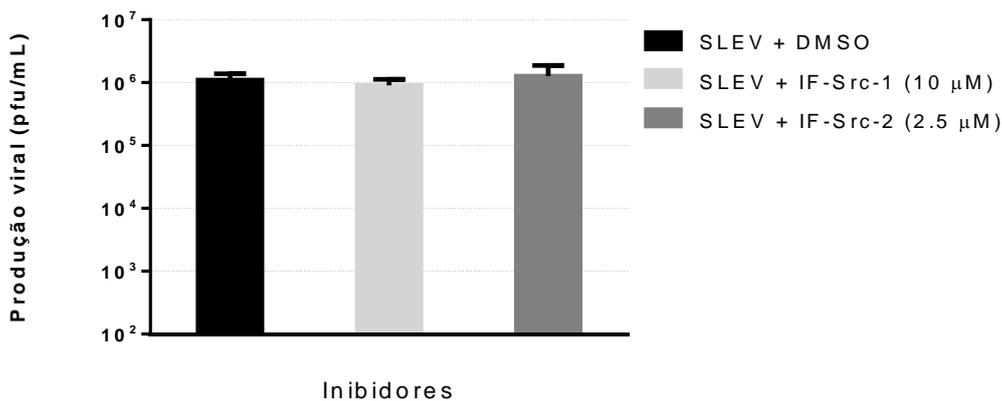


Figura 13: Ensaio Virucida realizado com o SLEV e os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 de Src/Abl. Neste ensaio, alíquotas do SLEV foram incubadas com as concentrações de uso dos respectivos inibidores e tituladas. Os inibidores não apresentaram efeito direto sobre a partícula viral, pois o tratamento com os fármacos não afetou a capacidade de multiplicação do SLEV em células BHK-21.

5.3 Análise da potencial atividade antiviral dos inibidores de Src/Abl frente à infecção com o SLEV.

5.3.1 Curva Dose-Resposta dos títulos de SLEV frente ao tratamento com os inibidores de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2) e dos inibidores de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2).

Para verificar a potencial atividade antiviral dos inibidores acima e determinar a melhor concentração de uso, o SLEV foi incubado em células BHK-21 na ausência e na presença de diferentes concentrações de cada inibidor. Podemos verificar que os inibidores farmacológicos IF-Src-1 e IF-Src-2 apresentaram uma potencial ação antiviral contra o SLEV. No ensaio onde a multiplicação do vírus foi efetuada na presença de diferentes concentrações do IF-Src-1, foi possível observar uma redução dose dependente nos títulos virais produzidos (figura 14). Na concentração de 20 µM, ocorreu uma redução significativa, de aproximadamente 2.5 log₁₀ e 3 log₁₀ no título viral, comparado ao controle sem tratamento, nos tempos de 36 e 48 horas, respectivamente. Na concentração de 10 µM, podemos observar uma redução de aproximadamente 1.5 log₁₀ no título viral, nos tempo de 36 e 48 horas. O tratamento com

diferentes concentrações do inibidor IF-Src-2 também promoveu uma redução significativa dos títulos virais (figura 14), nas concentrações de 5, 2.5 e 1.25 μM podemos observar, respectivamente, uma redução de aproximadamente 2.5, 2 e 1 \log_{10} no tempo de 36 horas, e no tempo de 48 horas também observamos o mesmo padrão de dose dependência de redução do título viral em relação ao aumento da concentração dos inibidores. Como controle, foi realizado também um ensaio de dose-resposta com os inibidores de MEK/ERK, IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2 (figura 15). A potencial ação antiviral destes inibidores contra o DENV, YFV e SLEV já havia sido descrita em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, e neste ensaio, confirmamos uma relação de dose-dependência do título do SLEV na presença de diferentes concentrações destes inibidores.

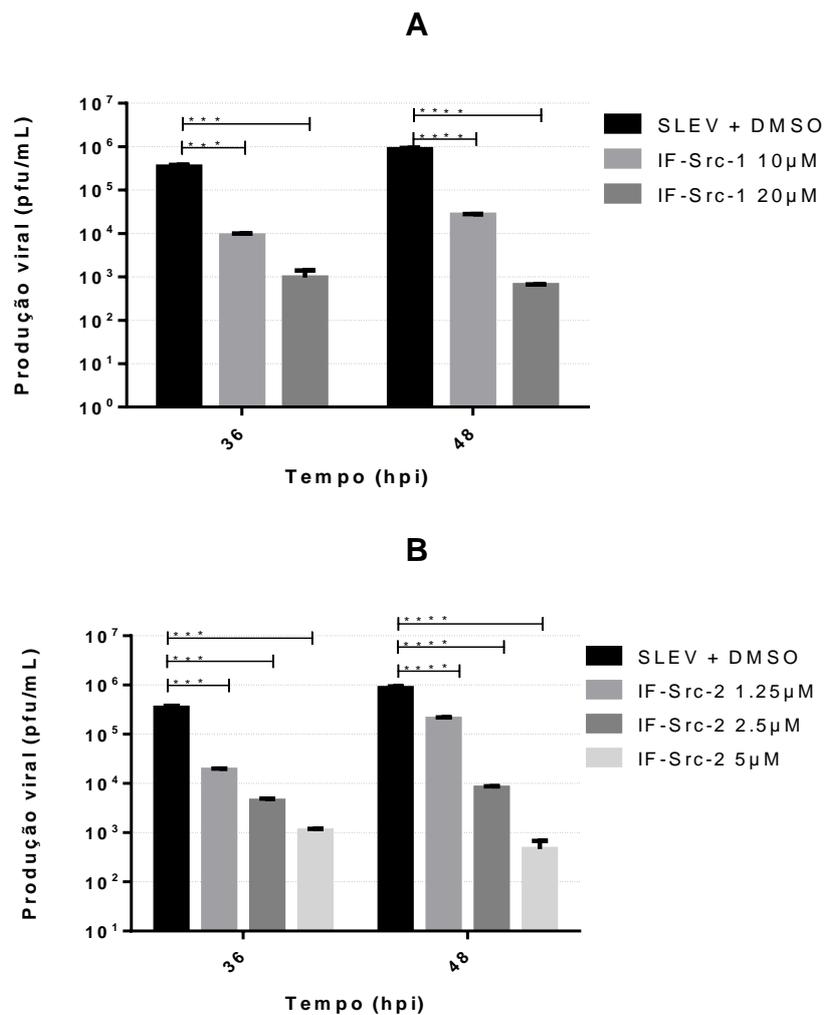


Figura 14: Curva Dose-Resposta dos títulos de SLEV frente ao tratamento com os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 (Src). A ação dos inibidores frente ao SLEV foi verificada realizando-se a multiplicação do vírus na ausência ou presença de diferentes concentrações de cada IF, como indicado: (A) – IF-Src-1 e B) – IF-Src-2. Células BHK-21 pré e pós-tratadas com os IFs e infectadas com SLEV a M.O.I.=1,0. Após 36 e 48 h.p.i., os sobrenadantes foram coletados e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (**P<0.01, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

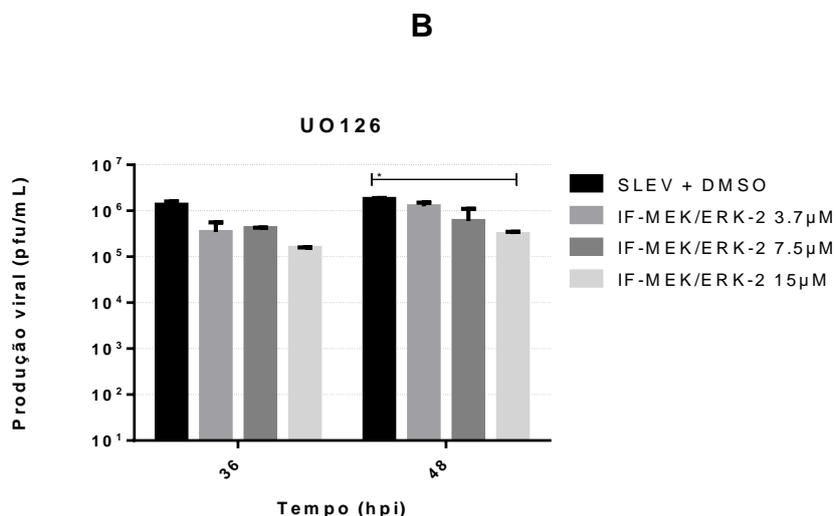
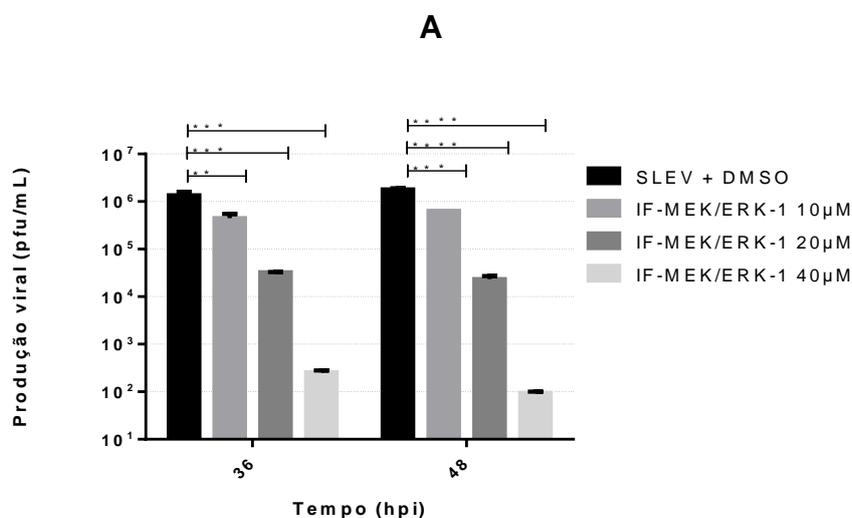


Figura 15: Curva Dose-Resposta dos títulos de SLEV frente ao tratamento com os inibidores IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK-ERK-2 (MEK/ERK). A ação dos inibidores frente ao SLEV foi verificada realizando-se a multiplicação do vírus

na ausência ou presença de diferentes concentrações de cada IF, como indicado. Células BHK-21 pré e pós-tratadas com os IFs: A) – IF-MEK/ERK-1 e B) – IF-MEK/ERK-2, e, posteriormente, infectadas com SLEV a M.O.I.=1,0. Após 36 e 48 h.p.i., os sobrenadantes foram coletados e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (**P<0.001, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

5.3.2 Curva de Multiplicação do SLEV frente ao tratamento com os inibidores de Src/Abl.

Após a determinação das concentrações de uso ideais para os experimentos *in vitro*, realizamos uma curva de multiplicação do vírus na presença e na ausência dos inibidores para avaliar o efeito destes ao longo do ciclo de multiplicação viral. As concentrações utilizadas para a construção das curvas com os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 foram de 10 e 2.5 µM, respectivamente. Apesar das concentrações maiores, de 20 e 5 µM, apresentarem uma maior redução no título viral, concentrações intermediárias dos inibidores foram escolhidas para evitar um possível efeito citotóxico nos experimentos realizados em tempos prolongados e também para garantir uma maior especificidade dos inibidores. Já se sabe que em concentrações maiores o espectro de ação destes inibidores pode ser ampliado, podendo se estender assim, a outras cinases sinalizadoras.

Foram realizadas curvas de multiplicação com M.O.I. de 1.0, a mesma usada nos ensaios de dose resposta, onde também foi observado uma redução nos títulos virais de aproximadamente 1 log₁₀ (IF-Src-1) no tempo de 36 horas e 2 log₁₀ (IF-Src-2) nos tempos de 24, 36 e 48 h.p.i (figuras 16 e 17). Para avaliar melhor o efeito dos inibidores de Src/Abl e elucidar se a ação destes pode estar relacionada à inibição na etapa de disseminação viral, foram realizadas curvas com M.O.I mais baixa de 0,01. De fato, observou-se uma maior redução no título viral para o inibidor IF-Src-1, de quase 2 log₁₀ nos tempo de 48 e 72 h.p.i (figura 16), mantendo-se aproximadamente 2 log₁₀ para o inibidor IF-Src-2 nos tempos de 48 e 72 h.p.i (figura 17).

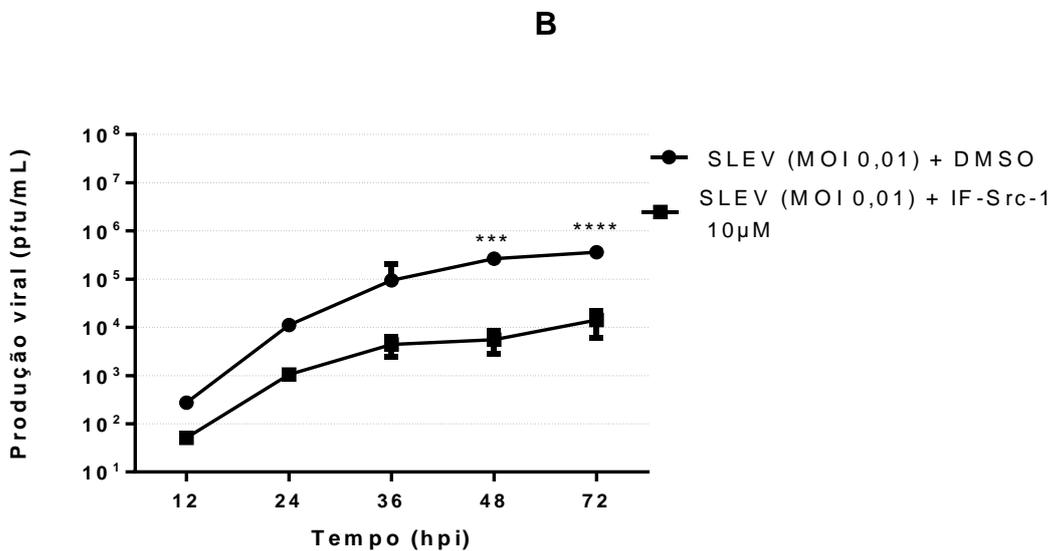
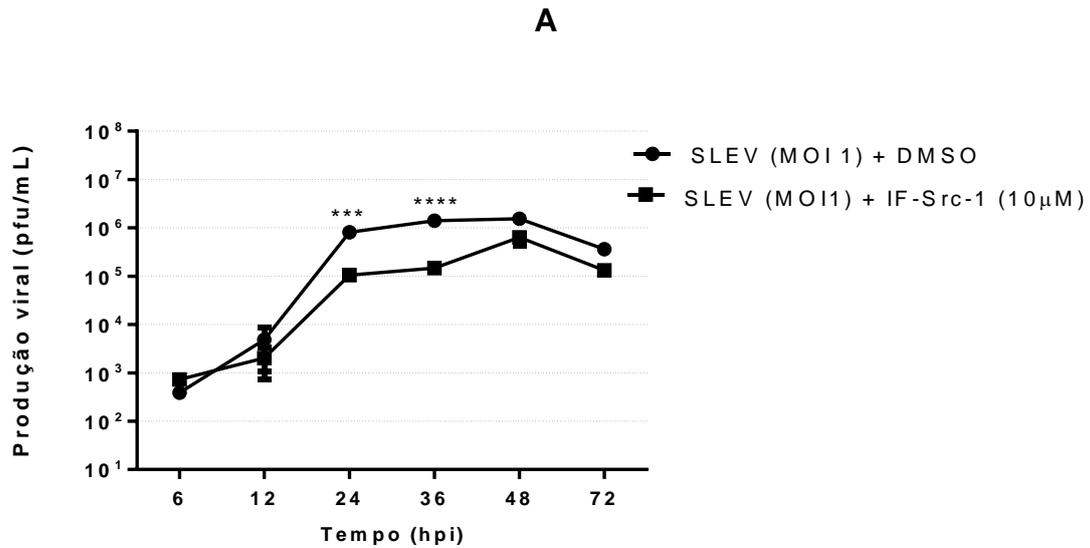
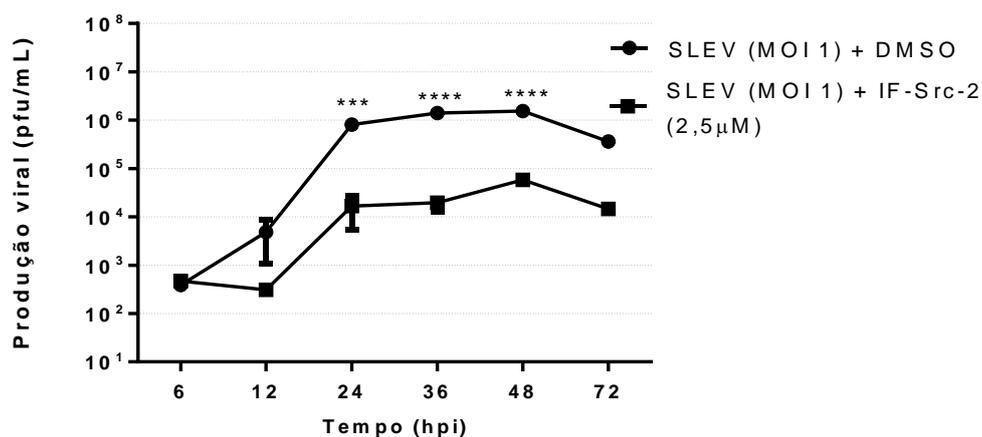


Figura 16: Curva de Multiplicação do SLEV frente ao tratamento com o inibidor IF-Src-1 (Src). A ação do inibidor frente ao SLEV foi verificada realizando-se a multiplicação do vírus na ausência ou presença inibidor, como indicado. Células BHK-21 pré e pós-tratadas com o inibidor e infectadas com SLEV a M.O.I. 1,0 (A) ou 0,01 (B). Após 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h.p.i., os sobrenadantes foram coletados e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (***) $P < 0.001$, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

A



B

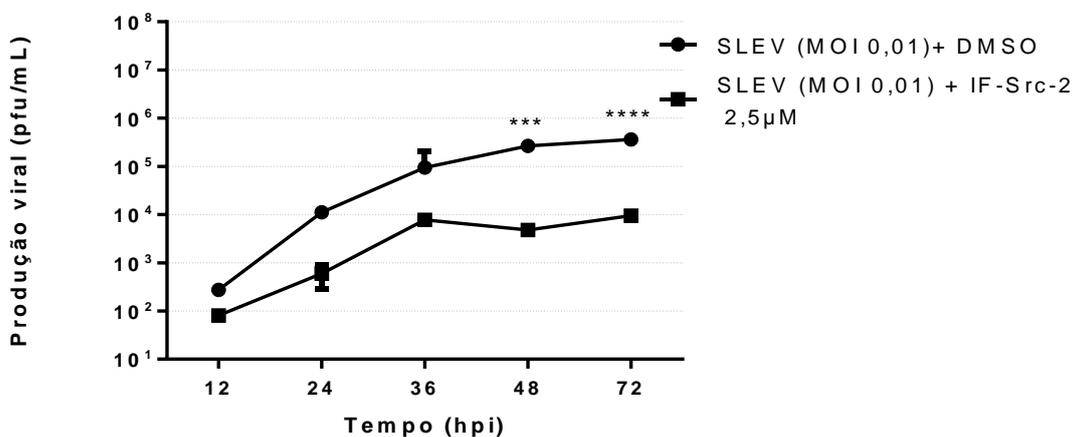


Figura 17: Curva de Multiplicação do SLEV frente ao tratamento com o inibidor IF-Src-2 (Src/Abi). A ação do inibidor frente ao SLEV foi verificada realizando-se a multiplicação do vírus na ausência ou presença inibidor, como indicado. Células BHK-21 pré e pós-tratadas com o inibidor e infectadas com SLEV a M.O.I. 1,0 (A) ou 0,01 (B). Após 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h.p.i., os sobrenadantes foram coletados e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (***) $P < 0.001$, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

5.4 Análise da potencial atividade antiviral dos inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 frente à infecção com o DENV-3.

Para verificar a potencial ação antiviral dos inibidores acima frente a outro vírus membro da família *Flaviviridae*, o vírus DENV-3 foi incubado em células BHK-21 na presença e na ausência dos distintos inibidores farmacológicos, diluídos nas concentrações de uso já determinadas anteriormente para o SLEV. Podemos verificar que os inibidores farmacológicos de Src/Abl também apresentaram uma potencial ação antiviral contra o DENV-3 (figura 18). Quando a multiplicação foi efetuada em presença do inibidor IF-Src-2, podemos observar uma redução significativa de quase 2 log₁₀ nos títulos virais, comparado ao controle, no tempo de 72h. O inibidor IF-Src-1 demonstrou uma redução de pelo menos 1 log₁₀, no tempo de 72h, sendo também eficaz ao inibir a multiplicação de DENV-3, quando comparado ao controle.

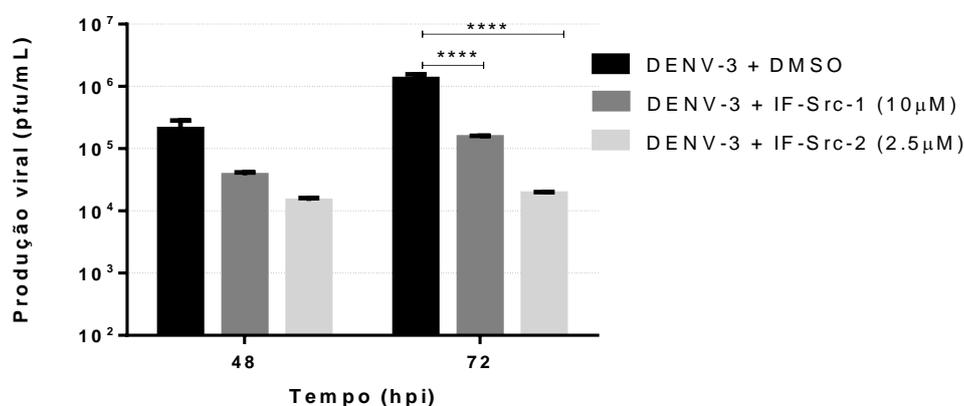


Figura 18: Análise da ação antiviral dos inibidores de Src/Abl frente ao DENV-3. A ação dos inibidores frente ao DENV-3 foi verificada realizando-se a multiplicação do vírus na presença ou ausência dos inibidores farmacológicos, nas concentrações indicadas. Células BHK-21 foram pré e pós-tratadas com os inibidores e infectadas com DENV-3 a MOI = 0,01. Após 48 e 72 h.p.i., os sobrenadantes foram coletados e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (***)P<0.001, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

5.5 Cinética de fosforilação de Src e de MEK/ERK após a infecção de células BHK-21 com o SLEV

Uma cinética foi realizada para verificar se a fosfotirosina c-Src é ativada durante o ciclo de multiplicação do SLEV. A cinética de c-Src foi avaliada através da detecção da fosforilação do resíduo de tirosina 418, presente no sítio catalítico SH2 da cinase e um dos alvos de auto-fosforilação. Neste ensaio, células BHK-21 foram carenciadas por 12hs com meio DMEM suplementado com 1% de SFB e infectadas com o SLEV a uma M.O.I 1.0. As células foram coletadas nos tempos de 30', 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 36 h.p.i. O controle do experimento (mock) foi realizado com células estimuladas com o sobrenadante de células C6/36 não-infectadas, usadas para a multiplicação do vírus. Os extratos proteicos celulares foram devidamente preparados e a sua reatividade foi avaliada, por meio de transferência de Western, utilizando-se um anticorpo específico para a detecção de Src fosforilada (Anti-Src/pY⁴¹⁸). É possível observar que a infecção com o SLEV, ao contrário do esperado, promove uma redução na fosforilação de Src. Nos tempos de 30', 1, 24 e 36 h.p.i, podemos observar a ativação basal de Src nas células estimuladas com o mock, mas nas células infectadas a ativação não é observada em nenhum dos tempos avaliados (figura 19). Este resultado sugere que o efeito antiviral observado após o tratamento com os IFs de Src pode não estar relacionado diretamente à inibição de Src, mas provavelmente, a outras fosfotirosinas que podem estar sendo inibidas também. A fosforilação de ERK1/2 também foi avaliada, neste caso, a infecção pelo SLEV promoveu um aumento na fosforilação de ERK1/2 comparado ao mock, semelhante ao observado em trabalhos anteriores do grupo GTS com o vírus da Dengue e da febre amarela. Este resultado indica que esta via sinalizadora pode ser importante para a multiplicação desta família viral e pode explicar a redução do título viral observada após o tratamento com os inibidores de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2).

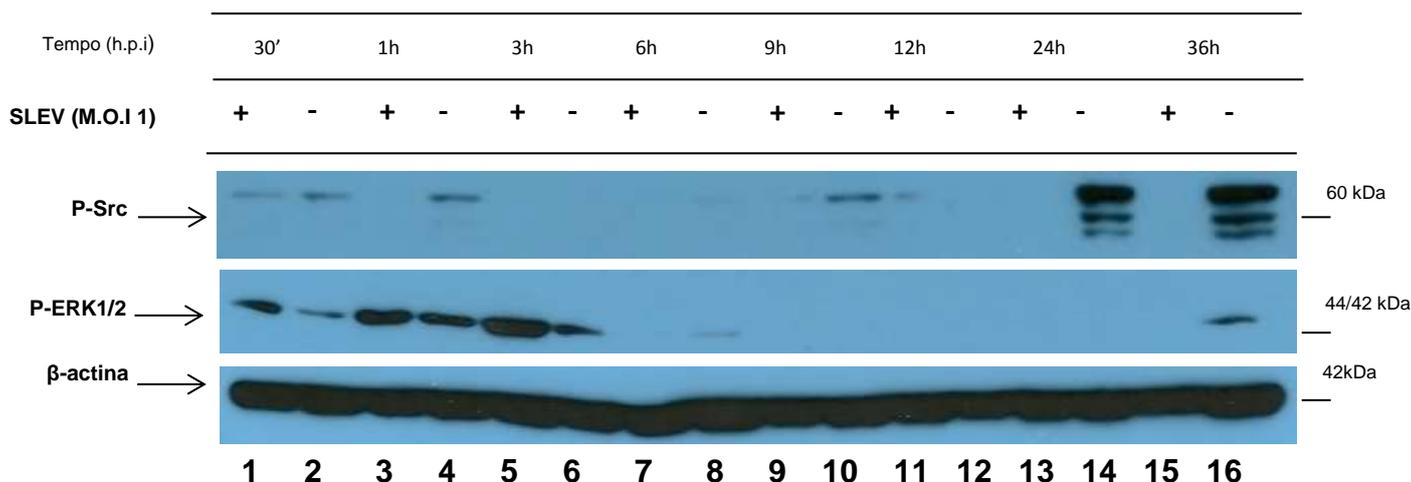


Figura 19: Cinética de fosforilação de Src e de ERK1/2 em células BHK-21 infectadas com o SLEV. A- Transferência do Western realizada com extratos de células BHK-21 (25 μ g), infectadas com o SLEV e detectadas com anticorpo anti p-Src ou p-ERK1/2. As células foram carenciadas com 1% SFB por 12hs e infectadas com o SLEV (M.O.I. 1) ou estimuladas com o sobrenadante de células C6/36 (mock), nos tempos de 30', 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 36 h.p.i (canaletas 1 a 16). A quantidade de proteínas aplicada em cada canaleta foi normalizada utilizando-se o anticorpo anti- β -actina.

5.6 Cinética de inibição da fosforilação de Src após o tratamento de células BHK-21 com os inibidores de Src/Abl.

Foi realizado um ensaio de transferência de Western para confirmar a inibição da fosforilação da cinase Src após o tratamento com os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2. Neste ensaio, a reatividade do anticorpo para a detecção de p-Src (Anti-Src/pY⁴¹⁸) foi testada contra extratos proteicos de células BHK-21, não carenciadas, estimuladas [através da infecção com o SLEV (M.O.I 1,0) ou da adição de 10% de SFB para a ativação da cinase] e tratadas com o inibidor IF-Src-1 (10 μ M) ou IF-Src-2 (2,5 μ M) durante diferentes tempos. Para os tratamentos, os inibidores foram diluídos em meio de cultivo e mantidos durante os tempos de 30 minutos, 2 e 36 h.p.i com o SLEV ou após a adição do SFB. Podemos observar que o efeito do inibidor IF-Src-1 sob a fosforilação de Src ocorre logo após a sua adição no tempo inicial de 30 minutos, e que para o inibidor IF-Src-2 este efeito foi observado a partir do tempo de 2 horas.

A inibição foi observada também para outras cinases da família de Src, pois estes inibidores atuam sobre alguns membros da família e o anticorpo utilizado também é capaz de reagir com outras SFKs. Foi possível verificar também que o efeito inibitório é prolongado, para ambos os inibidores, sendo observado até o último tempo avaliado neste experimento, de 36 h.p.i (figura 20).

5.7 Inibição da fosforilação via de sinalização de MEK/ERK após o tratamento de células BHK-21 com os inibidores de MEK1/2 (IF-MEK/ERK-1) e de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2).

Para avaliar a inibição da fosforilação da via de ERK1/2 após o tratamento com o inibidor IF-MEK/ERK-1 específico de MEK1/2 e com os IFs IF-Src-1 e IF-Src-2 de Src/Abl, foi realizado um ensaio de transferência de Western. Foi utilizado, neste ensaio, um anticorpo para a detecção de p-ERK1/2, que foi testado contra extratos proteicos de células BHK-21 tratadas com diferentes concentrações do inibidor IF-MEK/ERK-1 (20 μ M, 10 μ M e 5 μ M), IF-Src-1 (10 μ M) ou IF-Src-2 (2,5 μ M) pelo período de 24 horas. Na figura 21, verificamos que inibidor IF-MEK/ERK-1 é capaz de promover a inibição da fosforilação de ERK1/2 em todas as concentrações testadas após a infecção com o SLEV (M.O.I = 1,0).

Podemos observar também, na figura 22, que o tratamento das células BHK-21 não infectadas com os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 não inibe a fosforilação da via de MEK/ERK, portanto, a redução dos títulos virais associada ao tratamento com os inibidores de Src/Abl não está relacionada a um efeito inibitório subsequente das cinases ERK1/2. Estes resultados confirmam que o mecanismo de ação dos inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 de Src/Abl diferem do inibidor IF-MEK/ERK-1 de MEK1/2 e que ambas as vias parecem exercer um importante papel no ciclo de multiplicação desta família viral.

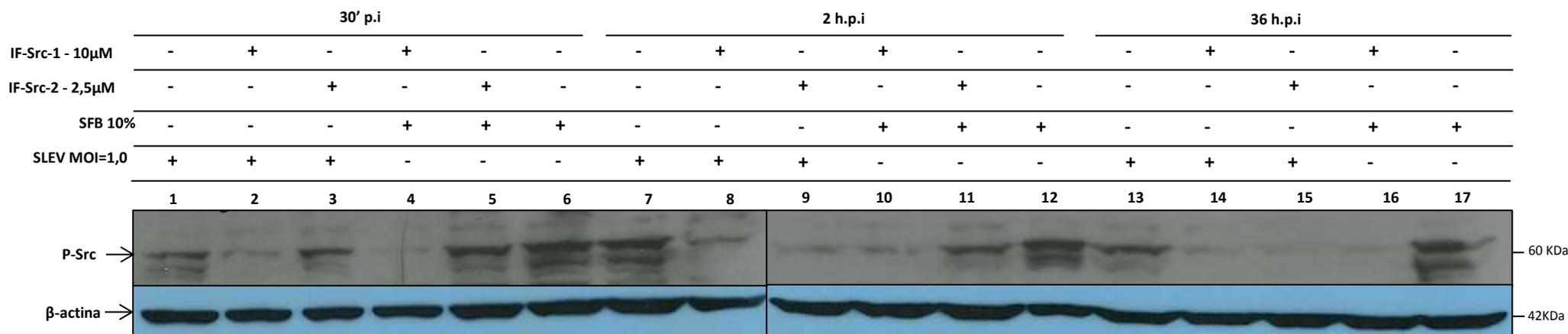


Figura 20: Inibição da fosforilação de Src após o tratamento com inibidores de Src/Abl. A ativação da cinase foi induzida em células BHK-21 através da infecção com o SLEV (M.O.I = 1,0) ou pela adição de 10% de SFB. Canaletas – 1 a 3: infectadas com SLEV por 30', 2 (pré-tratadas com IF-Src-1 10 μ M), 3 (pré-tratadas com IF-Src-2 2,5 μ M), canaletas 4 a 6: tratadas com 10% SFB por 30'; 4- (pré-tratadas com IF-Src-1 10 μ M), 5- (pré-tratadas com IF-Src-2 2,5 μ M), 6- (pré-tratadas com 10% SFB por 30'), canaletas 7 a 9: infectadas com SLEV por 2 h, 8- (pré-tratadas com IF-Src-1 10 μ M), 9- (pré-tratadas com IF-Src-2 2,5 μ M), canaletas 10 a 12: tratadas com 10% SFB por 2 h, 10- (pré-tratadas com IF-Src-1 10 μ M), 11- (pré-tratadas com IF-Src-2 2,5 μ M), canaletas 13 a 15: infectadas com SLEV por 36 h, 14- (pré-tratadas com IF-Src-1 10 μ M), 15- (pré-tratadas com IF-Src-2 2,5 μ M), canaletas 16 e 17: tratadas com 10% SFB por 36h. 16- (pré-tratadas com IF-Src-1 10 μ M), Normalização com anticorpo anti- β -actina.

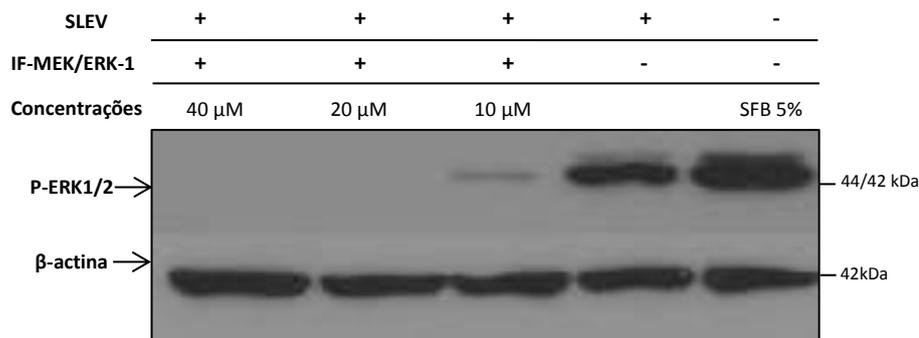


Figura 21: Inibição da fosforilação de ERK1/2 após o tratamento com diferentes concentrações do inibidor IF-MEK/ERK-1. Células BHK-21 foram infectadas com o SLEV (M.O.I=1) e tratadas com diferentes concentrações do inibidor.

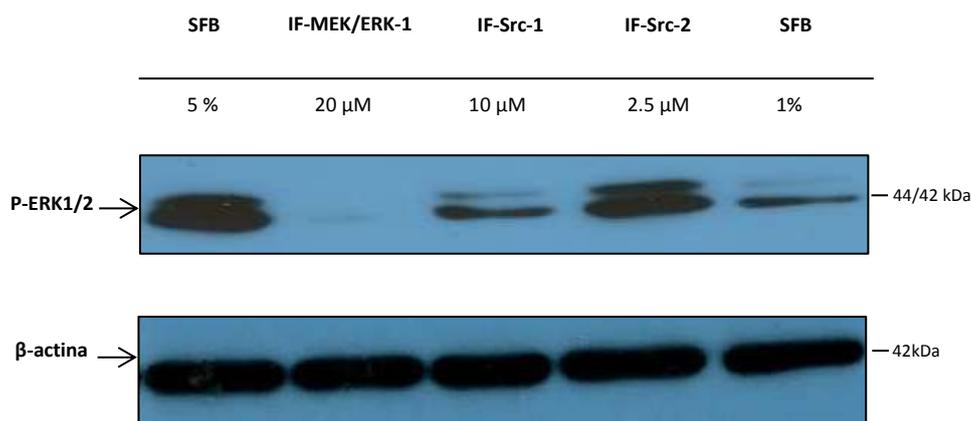


Figura 22: Inibição da fosforilação de ERK1/2 após o tratamento com inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 de Src/Abl. Células BHK-21 foram tratadas com diferentes concentrações dos inibidores IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK/ERK-1. As reatividades dos extratos proteicos celulares foram testadas utilizando um anticorpo para a detecção de p-ERK1/2. O inibidor IF-MEK/ERK-1 (MEK/ERK) foi capaz de inibir a fosforilação de ERK e os inibidores IF-Src-1 e IF-Src-2 (Src/Abl) não inibiram a fosforilação de ERK. Foi observado um leve aumento na fosforilação desta cinase após o tratamento com o inibidor IF-Src-2.

5.8 Análise cinética do efeito dos inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-2) no ciclo de multiplicação do SLEV

Para investigar em qual etapa do ciclo de multiplicação do SLEV os inibidores de Src estariam atuando, foram realizados experimentos onde o inibidor IF-Src-1 foi adicionado em diferentes tempos ao longo da infecção pelo SLEV, em M.O.I.=1,0. O inibidor foi adicionado durante o pré-tratamento, adsorção ou pós-tratamento. Podemos observar na figura 23, que somente o pré-tratamento das células com o inibidor IF-Src-1 anterior a adsorção, por 30 minutos, não tem efeito sobre a multiplicação do vírus comparado ao controle de vírus + DMSO. O tratamento com o inibidor somente durante a adsorção com o vírus e por 0-24 horas após a infecção, também não alteram o título viral. Estes resultados demonstram que provavelmente este inibidor não age nas etapas de adsorção, penetração/ internalização, desnudamento ou replicação do vírus. No entanto, a adição do inibidor após 24 horas exibiu o mesmo padrão de redução no título viral de 1 log₁₀ comparado ao controle no qual o inibidor foi mantido por 0-48 horas.

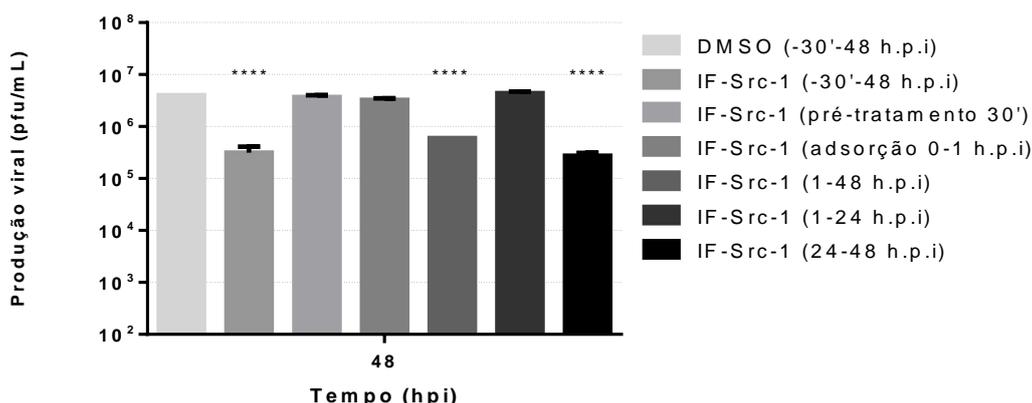


Figura 23: Análise cinética do efeito do inibidor IF-Src-1 (10µM) de Src no ciclo de multiplicação do SLEV (M.O.I.=1,0). Neste ensaio, células BHK-21 foram pré-tratadas com o inibidor por 30' e infectadas, ou tratadas somente no período da adsorção, ou ainda nos tempos de 1-24 horas e de 24-48 horas após a adsorção, como indicado à direita da figura. Os sobrenadantes foram

coletados no tempo de 48 h.p.i. e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (**P<0.001, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

Para confirmarmos o provável efeito em uma etapa tardia do ciclo de multiplicação viral, de morfogênese ou disseminação, realizamos o experimento em uma M.O.I. de 0,01 (ciclos múltiplos de multiplicação) com os inibidores de (IF-Src-1 e IF-Src-2 Src). Como controle foi utilizado o inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-2), pois, estudos anteriores do grupo GTS já demonstraram que a inibição desta via parece interferir na morfogênese do DENV e na replicação/morfogênese do YFV. Verificamos na figura 24-A, que o pré-tratamento/adsorção com o inibidor de MEK/ERK também não afeta a multiplicação do vírus, e que somente o tratamento entre os tempos de 0-24 horas após a adsorção promoveu uma redução no título viral comparado aos controles. A adição do inibidor após 24 horas não apresentou nenhum efeito sobre a multiplicação viral, confirmando que, assim como para o DENV e o YFV, a inibição desta via também pode estar relacionada às etapas de replicação ou morfogênese do SLEV. Na figura 24-B, podemos observar que em uma M.O.I. mais baixa o tratamento com o IF-Src-1 também apresentou os mesmos resultados citados anteriormente para a M.O.I. de 1,0. O inibidor é capaz de promover a redução do título do SLEV mesmo se adicionado 24 h.p.i. O inibidor IF-Src-2 também foi capaz de reduzir multiplicação do SLEV quando adicionado 24 h.p.i, no entanto, ele também promoveu a redução do título viral quando adicionado no tempo de 0-24 h.p.i indicando que ele pode estar agindo também em uma etapa anterior do ciclo de multiplicação (figura 24-C).

A

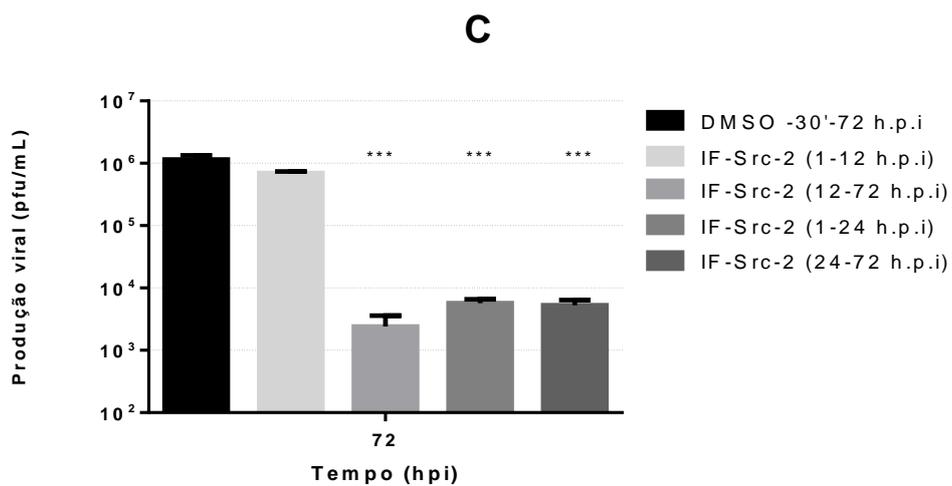
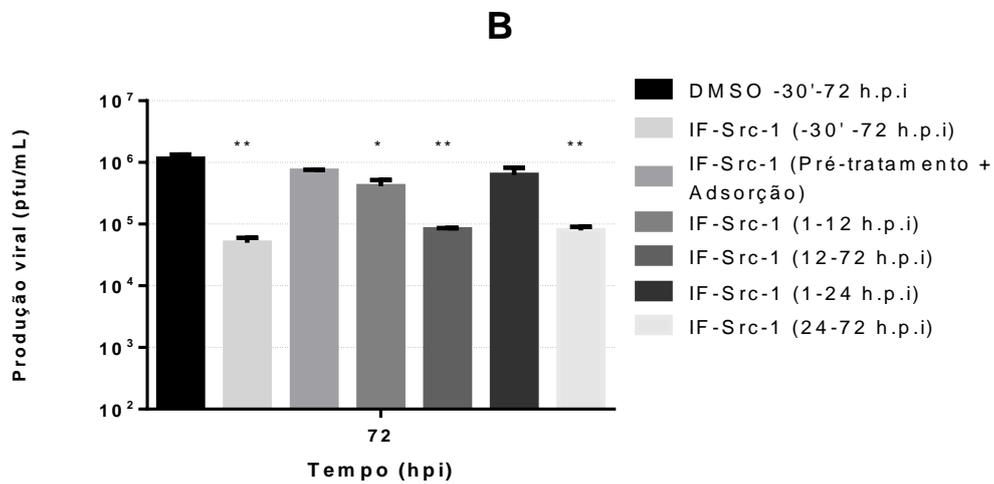
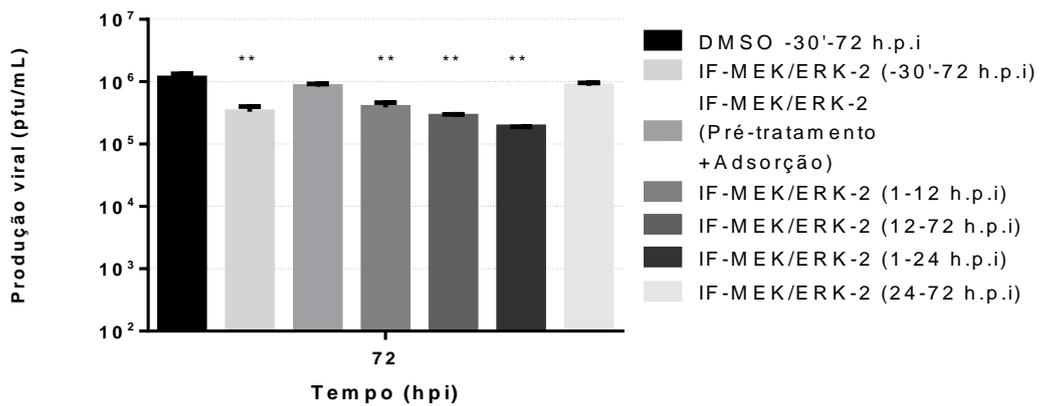


Figura 24: Análise cinética do efeito dos inibidores de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-2 15µM) e de Src (IF-Src-1 10µM e IF-Src-2 2.5µM) no ciclo de

multiplicação do SLEV (M.O.I.=0,01). Neste ensaio, células BHK-21 foram pré-tratadas com os inibidores de MEK/ERK (**A**) ou Src (**B e C**) por 30' e infectadas, ou tratadas somente no período da adsorção, ou ainda nos tempos de 1-12/0-24 horas e de 12-72/24-72 horas após a adsorção, como indicado a direita das figuras. Os sobrenadantes foram coletados nos tempo de 72 h.p.i. e titulados como descrito em Materiais e Métodos. (**P<0.001, Two-Way ANOVA (Bonferroni posttests)).

5.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para avaliar o eventual efeito dos IFs sobre a morfogênese do SLEV, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão de células BHK-21 infectadas. Neste ensaio, as células foram infectadas com SLEV a uma MOI de 1,0 e tratadas ou não com os inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) durante 36 horas. As amostras foram preparadas conforme descrito em materiais e métodos.

No controle celular não infectado (figura 25), podemos observar membranas e organelas celulares íntegras, como o Retículo endoplasmático rugoso e o complexo de golgi, importantes durante a morfogênese e liberação da partícula viral.

Controle não-infectado

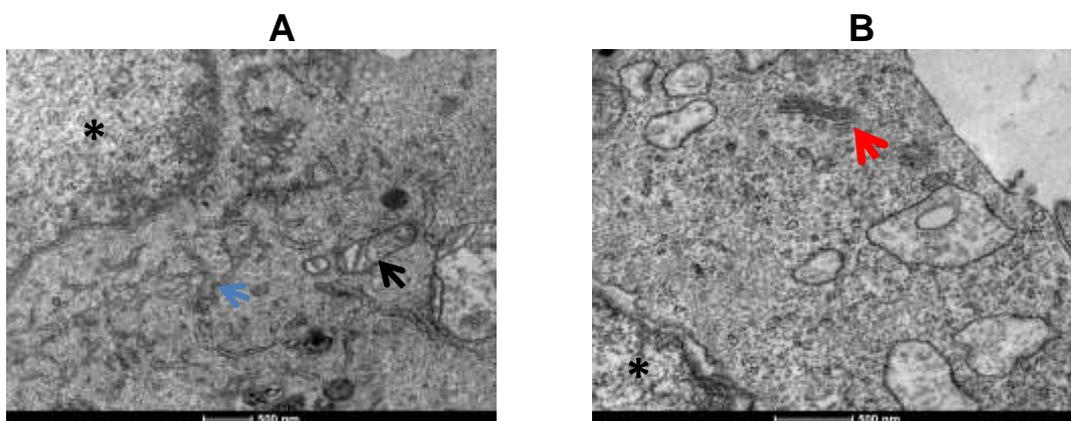


Figura 25: Micrografia eletrônica de transmissão mostrando (A e B) células BHK-21 não-infectadas. Asterisco - Núcleo; seta azul - Retículo Endoplasmático; seta preta - Mitocôndria; seta vermelha - Complexo de Golgi.

No controle de células infectadas e não-tratadas com os IFs (DMSO) podemos observar características típicas de infecções por flavivírus como a indução de rearranjos de membranas no citoplasma (figura 26). Estas invaginações, provenientes do Reticulo Endoplasmático (RE), são denominados pacotes de vesículas e servem para ancorar os complexos de replicação (CR) (setas azuis) onde ocorrerá a morfogênese viral, estes CR são formados pelo acúmulo de RNA e proteínas virais estruturais e não estruturais. No lúmen do RE podemos verificar também a presença de partículas virais (setas pretas) que serão transportadas pela rede trans-golgi onde sofrem a clivagem do prM e se tornam maduras. Observamos também no controle infectado, uma grande quantidade de células lisadas e a presença de vírions maduros, com tamanho aproximado de 50 nanômetros que apresentam um envelope externo e um cerne eletrodense. Estes vírions se encontram dentro de grandes vesículas citoplasmáticas, onde também podemos verificar o acúmulo de vesículas vazias (setas vermelhas), formadas durante a morfogênese viral, sem a presença de material eletrodense.

Nas figuras 27 e 28, podemos observar nas micrografias uma menor quantidade de células lisadas e de partículas virais (setas pretas) presentes dentro das vesículas citoplasmáticas após o tratamento com os IFs de Src (IF-Src-1 e If-Src-2), Nestas regiões, também observamos a presença de vesículas vazias (setas vermelhas) e de complexos de replicação (vesículas contendo um cerne eletrodense – setas azuis). O tratamento com os inibidores de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) (figura 29 e 30), também promoveu uma redução no número de partículas virais e um aumento no acúmulo de vesículas vazias (setas vermelhas) e de complexos de replicação (setas azuis).

Controle infectado - DMSO

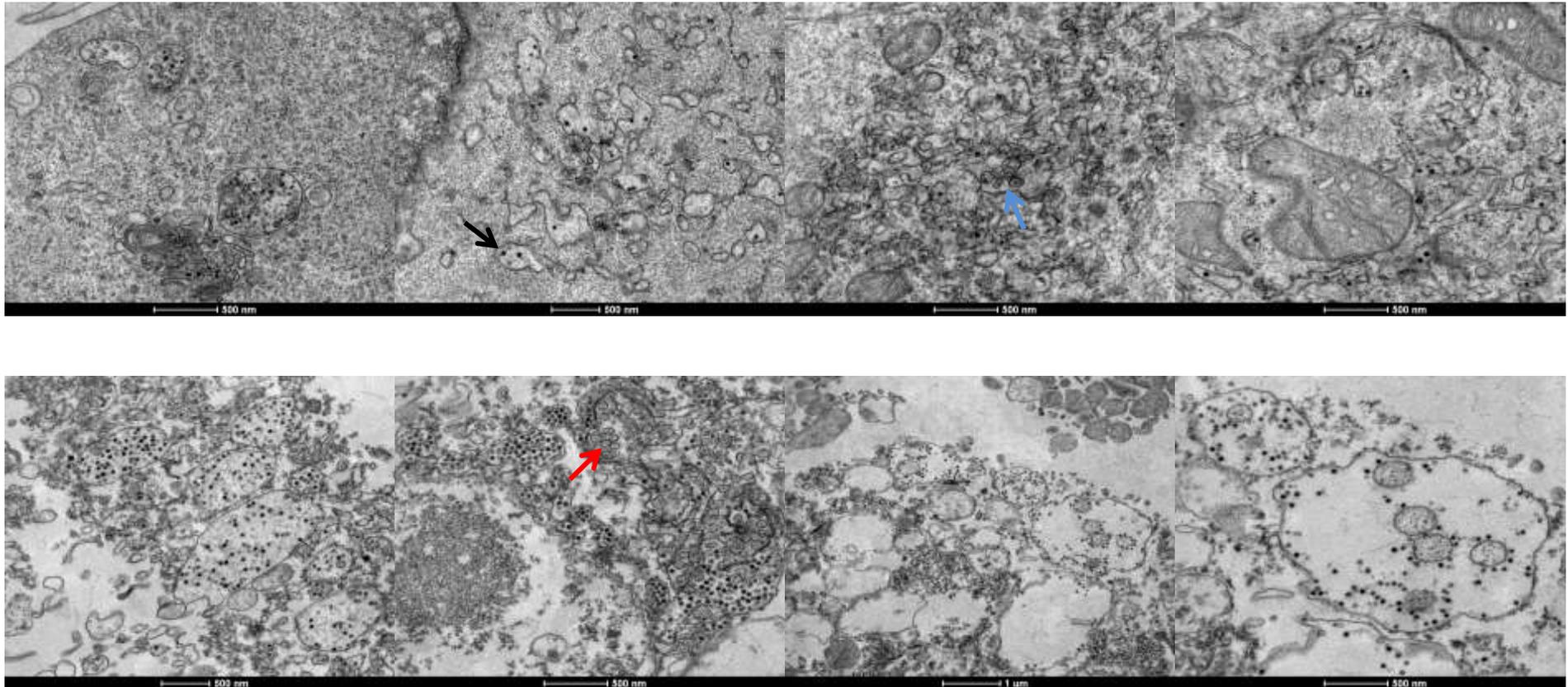


Figura 26: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com DMSO.

Tratamento - IF-Src-1

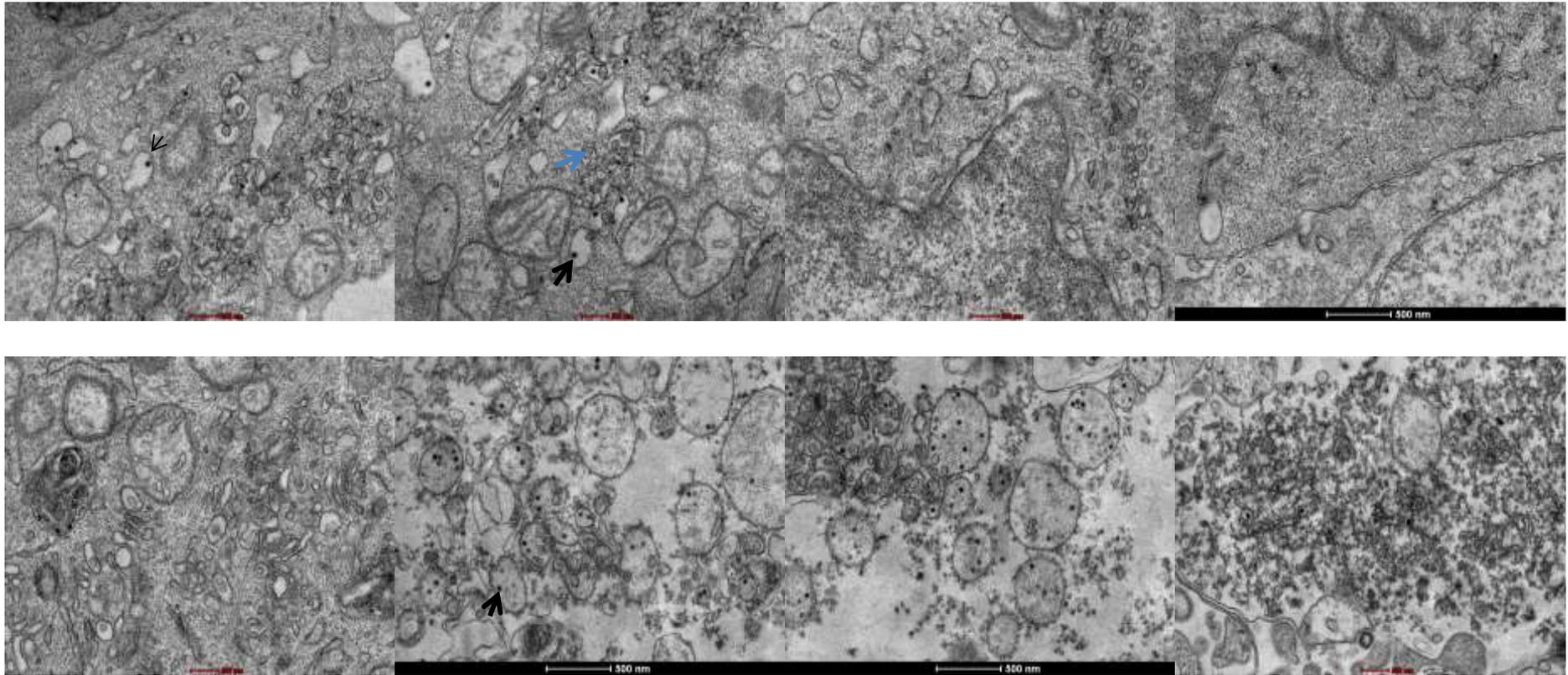


Figura 27: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de Src (IF-Src-1)

Tratamento - IF-Src-2

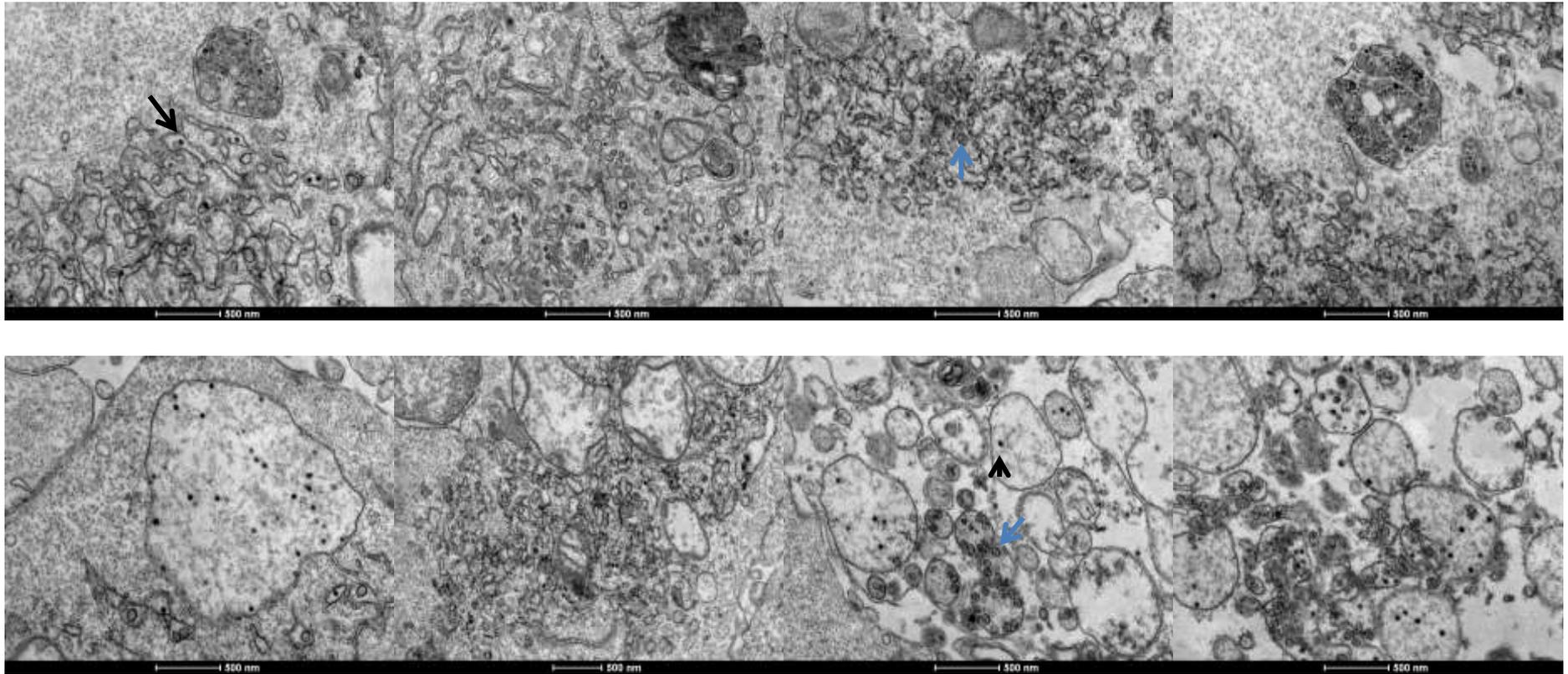


Figura 28: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de Src (IF-Src-2).

Tratamento IF-MEK/ERK-1

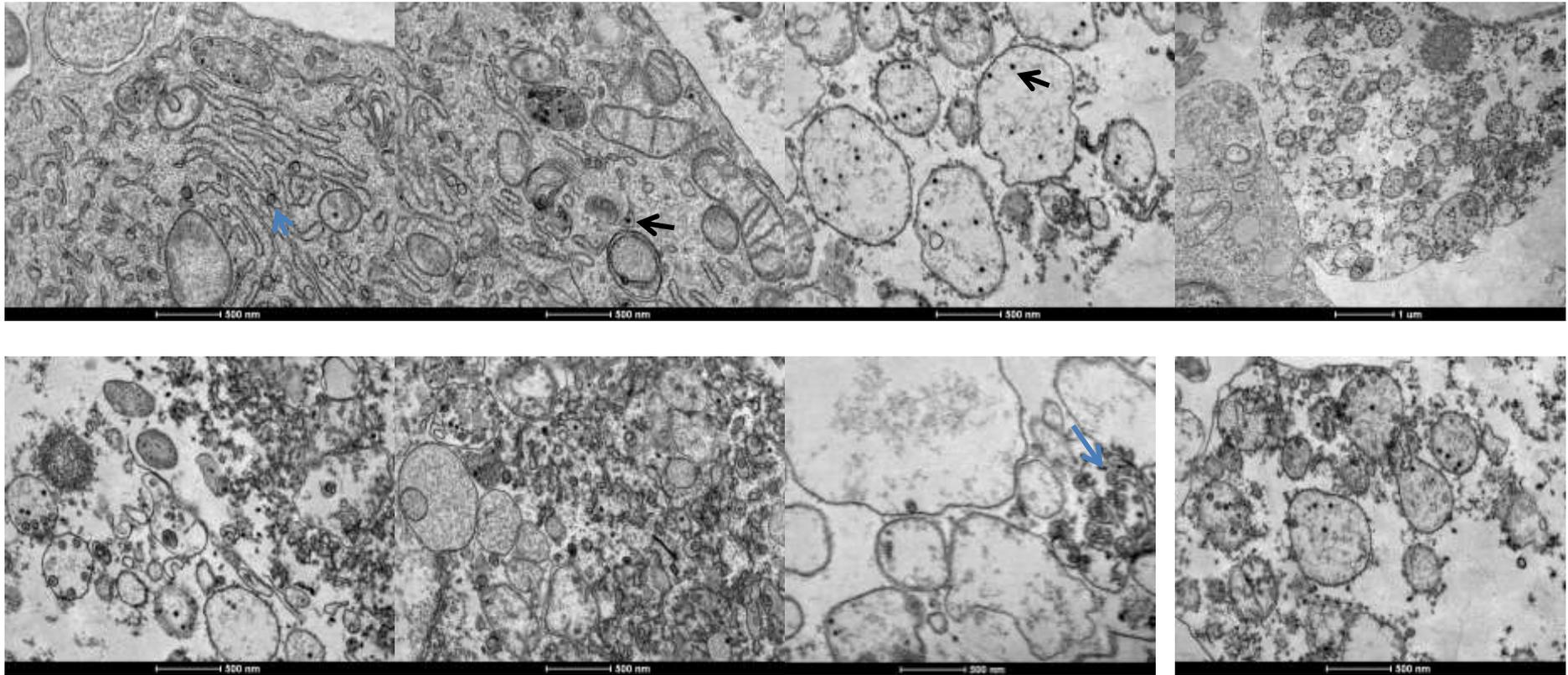


Figura 29: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1).

Tratamento IF-MEK/ERK-2

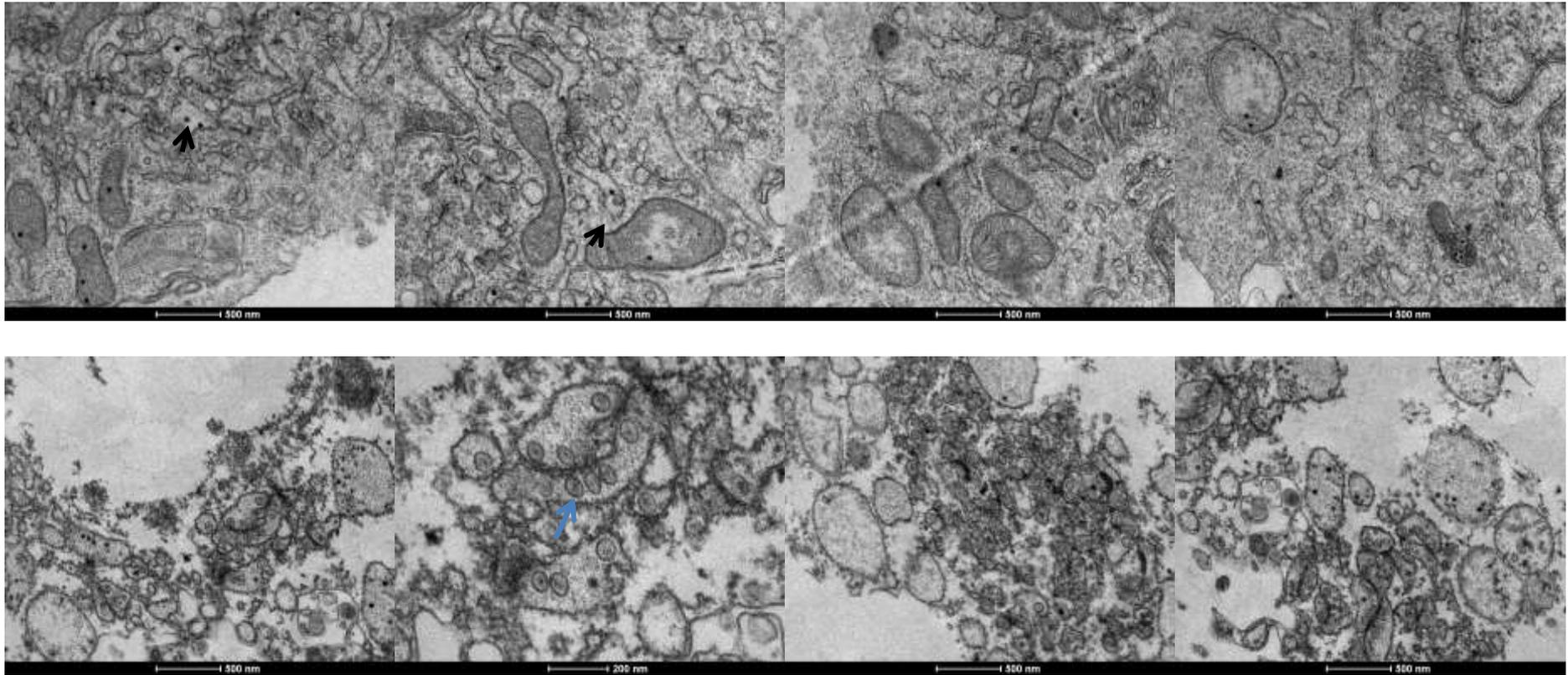


Figura 30: Micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV e tratadas com o inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-2).

No tempo de infecção avaliado, não foi possível determinar em qual etapa do ciclo de multiplicação do SLEV os IFs estariam atuando. No entanto, foi feita a quantificação do número de vírions, vesículas vazias e de complexos de replicação. O tratamento com todos os IFs promoveu uma redução no número de partículas virais formadas e um aumento no acúmulo de complexos de replicação quando comparados ao controle infectado. A quantificação foi estimada a partir da análise de 40 micrografias de cada tratamento, comparando-se aquelas que foram tratadas com o IF com o controle apenas infectado (figura 31).

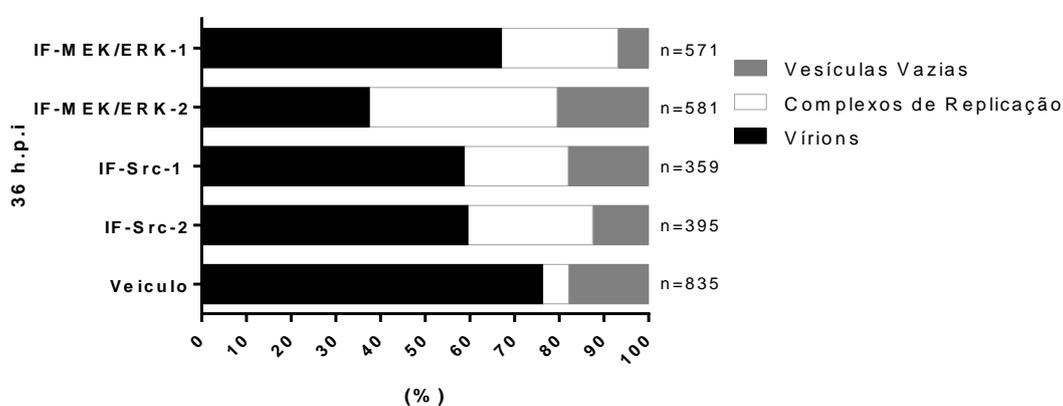


Figura 31: Quantificação de vírions, complexos de replicação e vesículas vazias. Quantificação estimada a partir de 40 micrografias eletrônicas de transmissão de células BHK-21 infectadas com o SLEV (MOI=1,0) e tratadas com os inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) ou com o veículo.

5.10 Avaliação do potencial efeito antiviral dos IFs em modelo animal

5.10.1 Confirmação do genoma viral no cérebro após a infecção intraperitoneal com o SLEV

Para a confirmação da presença do genoma viral no cérebro de animais infectados por via intracraniana (i.c) e intraperitoneal (i.p) foi realizado um ensaio de RT-PCR (conforme descrito em materiais e métodos). Os animais foram infectados com 200 UFP (i.c.) ou 10^4 UFP de SLEV (i.p.) e eutanasiados

no 6° (i.c) e 7° (i.p) dia após a infecção para a retirada dos cérebros. Foi constatada a presença do genoma viral no cérebro dos animais infectados por ambas as vias, i.c. e i.p. (figura 32).

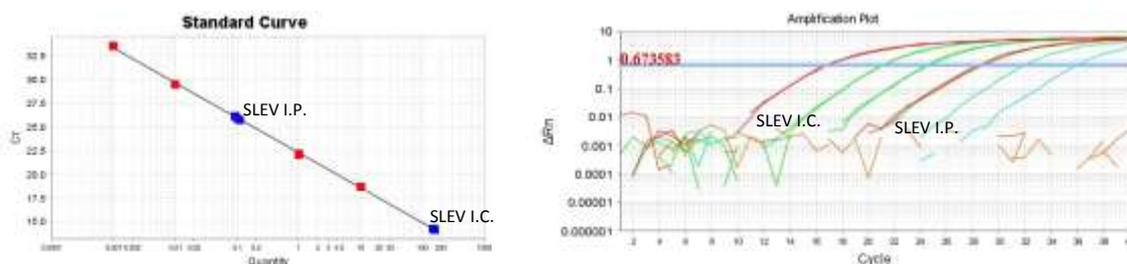


Figura 32: RT-PCR do cérebro de camundongos infectados com o SLEV por via intracraniana (i.c.) e intraperitoneal (i.p.). Os animais (n=1) foram infectados com 200 UFP/SLEV por via i.c. ou com 10^4 UFP por via i.p. e os cérebros foram retirados para a quantificação viral e a avaliação da disseminação viral.

Para confirmar a disseminação do vírus no cérebro dos camundongos, foi realizada a titulação por ensaio de placa viral a partir do cérebro dos animais. Neste ensaio, foram realizadas titulações do soro, cérebro e baço de animais infectados com 1×10^4 UFP/SLEV por via i.p. e eutanasiados em diferentes tempos 24, 48 e 72 h.p.i (figura 33). A titulação do SLEV no baço e cérebro foi confirmada também por RT-PCR. É possível observar a viremia no soro dos animais, com um pico no tempo de 48 horas, até o tempo de 72 horas. Podemos observar a disseminação viral no baço, nos tempos de 48 e 72 horas, e no cérebro, a partir de 72 horas. Os resultados da RT-PCR e da titulação confirmam a disseminação do vírus para o cérebro após a infecção i.p. com SLEV. Foi realizada também a titulação dos órgãos de animais infectados com o SLEV por via i.p. e eutanasiados no 7° d.p.i. No entanto, não foi possível observar placas de lise na titulação do cérebro e outros órgãos neste tempo de infecção.

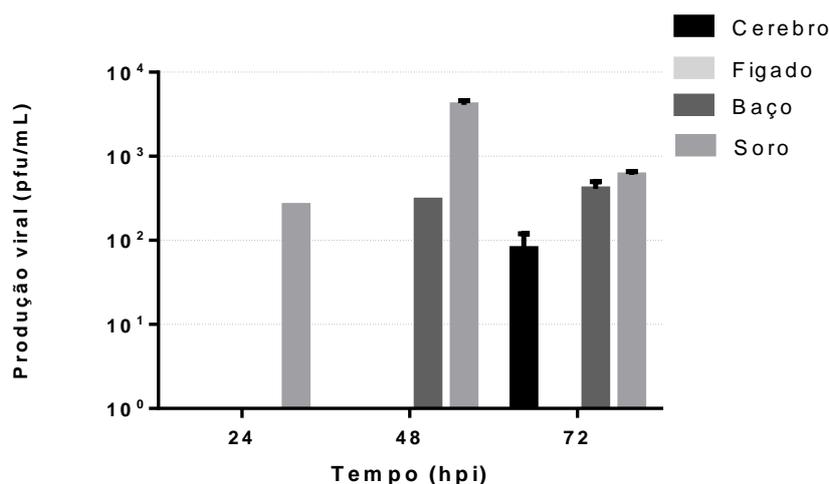


Figura 33: Titulação do SLEV a partir de órgãos de camundongos infectados. Os animais (n=2) foram infectados por via i.p. com 10^4 UFP/animal do vírus e eutanasiados em diferentes tempos (24, 48 e 72 h.p.i) para a titulação do vírus no cérebro, baço e soro, conforme descrito em materiais e métodos.

5.10.2 Estudo da Dose-Letal 50 (DL50)

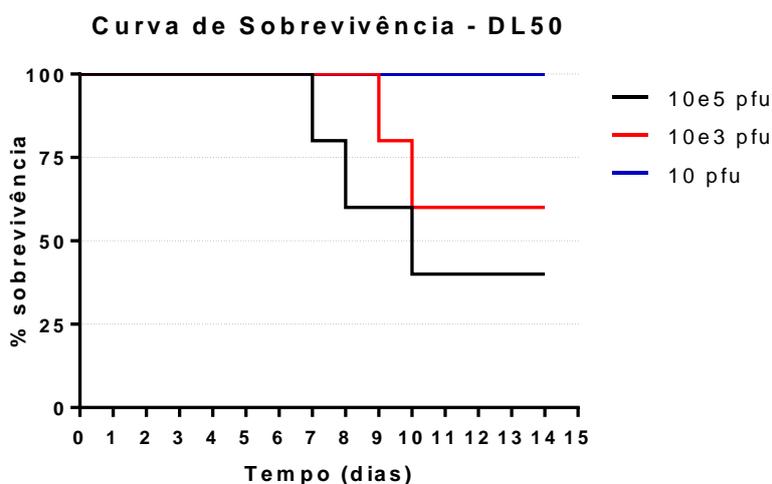
Após a confirmação da presença do genoma do SLEV no cérebro dos animais infectados por via intraperitoneal, foi realizado um experimento para a determinação da Dose-letal 50 por meio do protocolo “OECD TG 420 – toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas” e posteriormente, a escolha da dose infectiva viral a ser utilizada nos experimentos com os IFs. O experimento foi realizado com 3 grupos de 5 animais infectados por via i.p. com 100 μ L de diferentes diluições do SLEV (~ 10 UFP/ 10^3 UFP/ 10^5 UFP). Os animais foram pesados diariamente e acompanhados para a observação de sinais clínicos até o 15º dia após a infecção. Os sinais comumente observados nos animais infectados após o 6º dia de infecção foram piloereção, fotosensibilidade, prostração, arqueamento de dorso e perda de peso. Em todos os experimentos realizados, somente dois animais apresentaram paralisia dos membros inferiores. Os animais infectados morrem rapidamente após o aparecimento dos sinais clínicos citados, e a mortalidade acontece entre o 7º e o 10º d.p.i. Como podemos observar a diluição de 10 UFP não foi suficiente para provocar uma infecção letal em nenhum dos animais, que apresentaram 100% de sobrevivência e também não apresentaram nenhum

sinal clínico da infecção, somente piloereção no 3º d.p.i. No entanto, quantidades virais maiores de 10^3 e 10^5 UFP foram capazes de promover uma infecção letal, com uma mortalidade de 40% e 60%, respectivamente (figura 34). A partir deste estudo, o inoculo viral determinado para a realização dos experimentos com os IFs foi a diluição viral de 10^{-2} (ou $\sim 10^4$ UFP).

Tabela 6 - Estudo da DL50

Diluição SLEV (\log_{10})		Camundongos		Percentual de mortalidade (%)
		Infectados	Sobreviventes	
10^{-5}	(~ 10 UFP)	5	5	0
10^{-3}	($\sim 10^3$ UFP)	5	3	40
10^{-1}	($\sim 10^5$ UFP)	5	2	60

A



B

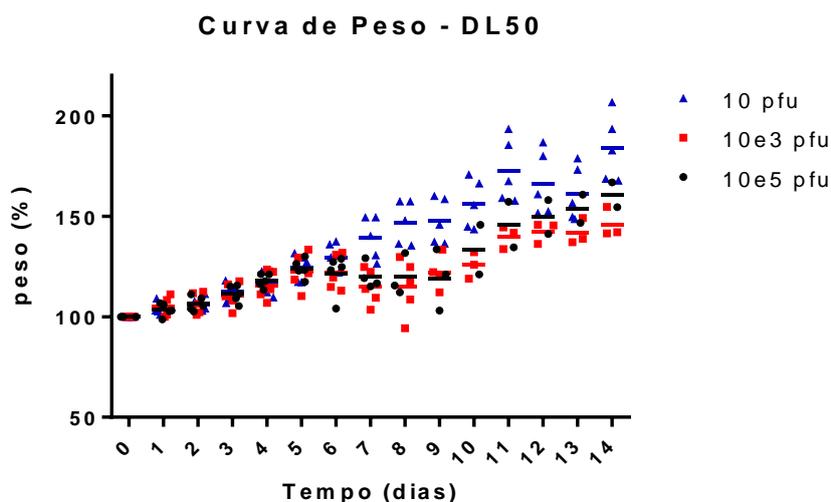


Figura 34: Curva de Sobrevivência (A) e curva de peso (B) para determinação da DL50. Os animais (n=5) foram infectados por via i.p. com 10, 10^3 e 10^5 UFP/animal do SLEV, pesados e acompanhados por 15 dias para a determinação do inoculo viral a ser utilizado nos experimentos com os IFs.

5.10.3 Tolerabilidade dos camundongos aos IFs IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK/ERK-1.

Foi realizado um teste prévio para avaliar se as concentrações dos IFs recomendadas pelo fabricante e escolhidas para os experimentos *“in vivo”* não ocasionariam toxicidade ou mortalidade nos animais. A concentração de uso em camundongos do inibidor IF-MEK/ERK-1 já havia sido determinada também em trabalhos anteriores do grupo GTS com o DENV (Ribeiro, 2015, em preparação). Os animais foram inoculados por via i.p. com o sobrenadante de células C6/36 não infectadas e tratados com as seguintes concentrações de cada IF: IF-Src-1 (25mg/kg/dia), IF-Src-2 (150mg/kg/dia) e IF-MEK/ERK-1 (100mg/kg/dia), o controle foi tratado com o veículo. O tratamento foi realizado por via oral (gavagem), duas vezes ao dia, durante 8 dias. Os animais foram pesados diariamente e observados para a avaliação de possíveis sinais clínicos, piloereção, prostração, perda de peso, etc.(figura 35). O tratamento com os diferentes IFs não resultou em sinais clínicos de toxicidade nos animais que pudessem ser observados nesta avaliação, portanto, as concentrações foram consideradas apropriadas para a realização dos experimentos.

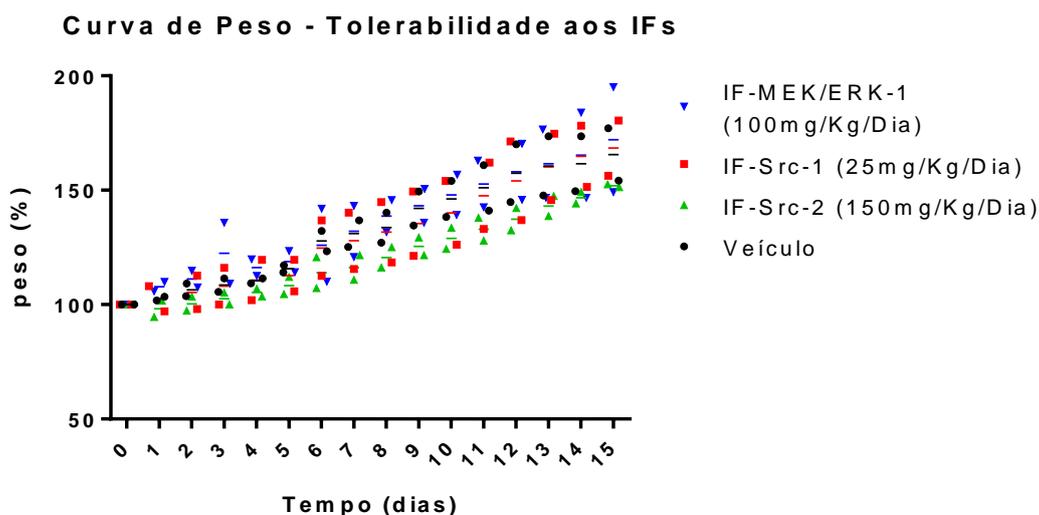


Figura 35: Curva de peso animais tratados com os IFs. Os animais (n=2) foram tratados com as concentrações recomendadas pelo fabricante para uso “*in vivo*” de cada IF: IF-Src-1 (25mg/kg/dia), IF-Src-2 (150mg/kg/dia) e IF-MEK-ERK-1 (100mg/kg/dia); pesados e observados diariamente para a avaliação dos sinais clínicos.

5.10.4 PCR quantitativa em tempo Real (RT-qPCR) do cérebro e baço dos animais infectados e tratados com os IFs.

Um ensaio de RT-qPCR foi realizado para a quantificação da carga viral após a infecção dos animais com 10^4 UFP do SLEV e o tratamento com os IFs (IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK-ERK-1). O tratamento com nenhum dos IFs foi capaz de reduzir significativamente a carga viral no cérebro e no baço dos animais infectados (figura 36) (Student’s t-test (* $P < 0.05$)). A quantificação da expressão do gene de interesse (SLEV) foi normalizada em relação ao gene de GAPDH e a expressão relativa do gene em resposta ao tratamento com os IFs foi normalizada em relação ao tratamento com o veículo. Não foi possível quantificar o título viral do SLEV no cérebro e baço por meio de titulação em placa nos animais sacrificados no 7° d.p.i.

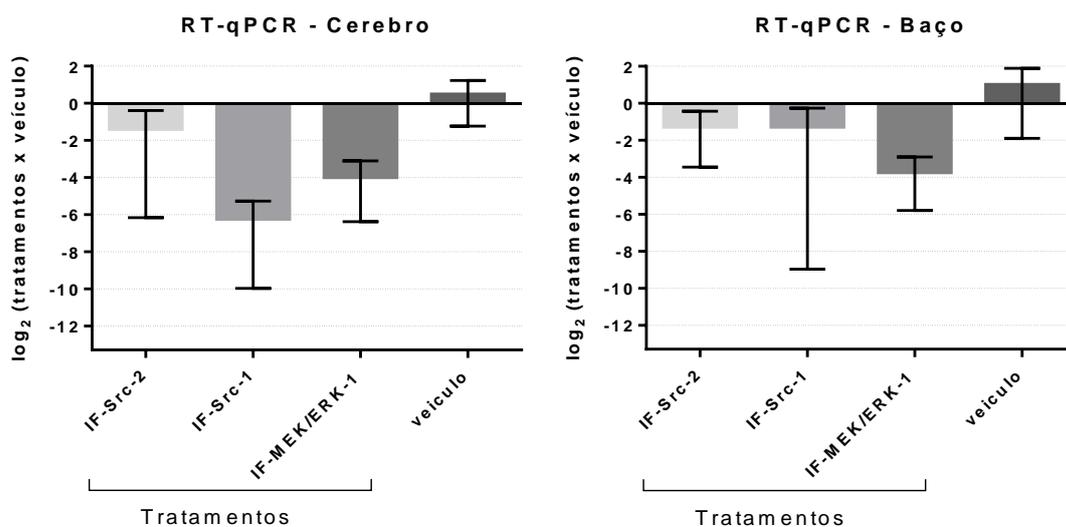


Figura 36: Análise de RT-qPCR do cérebro e baço de animais tratados com os IFs. Os animais (n=4) foram infectados com o SLEV (10^4 UFP), tratados com os IFs IF-Src-1, IF-Src-2 e IF-MEK-ERK-1 e sacrificados no 7º d.p.i. Quantificação relativa (RQ) mínima (RQ Min) e máxima (RQ Max) e erro padrão da média (SEM). (Student's t-test (*P<0.05)).

5.10.5 Curva de sobrevivência dos camundongos tratados com os IFs IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1 após a infecção com o SLEV.

Foi feita a avaliação do efeito dos IFs na sobrevivência dos animais infectados e tratados. Neste experimento, os camundongos (n=12) foram infectados com 10^4 UFP do SLEV por via i.p. e o tratamento com os IFs, IF-Src-1 (25mg/kg/dia) e IF-MEK/ERK-1 (100mg/Kg/dia), foi iniciado 12 horas após a infecção, sendo administrados duas vezes ao dia, durante 7 dias. O grupo controle (n=5) foi inoculado com sobrenadante de células C6/36 não infectadas e recebeu o tratamento com o mesmo veículo utilizado para a diluição dos IFs, conforme descrito na metodologia. Os camundongos foram pesados até o 15º dia. Podemos observar que 20% e 30% dos animais do grupo tratado com o IF-Src-1 e do grupo controle, respectivamente, começam a morrer no 7º d.p.i. Na avaliação dos sinais clínicos no 7º d.p.i todos os animais de ambos os grupos apresentavam sinais clínicos como piloereção e alguns apresentavam prostração, fotosensibilidade e arqueamento de dorso. No entanto, os animais tratados com o IF-MEK/ERK-1 não apresentavam nenhum sinal clínico da

infecção no 7° d.p.i, mas no 8° d.p.i os animais também evoluíram para o óbito. A taxa de mortalidade no grupo controle foi maior do que o esperado dentro do espectro de mortalidade determinado na DL50 de ~40-60% dos animais, sendo que no 8° d.p.i apenas 17% dos animais do grupo controle infectado sobreviveram. Nos grupos infectados e tratados, com ambos os IFs, 25% dos animais sobreviveram (figura 38). A diferença de sobrevivência entre os grupos infectados tratados com os IFs e os grupos infectados tratados apenas com o veículo não foi estatisticamente significativa (* $p < 0.05$) usando o teste estatístico log-rank. Na curva de peso, podemos observar que no 4°, 5°, 6° e 7° d.p.i os animais dos grupos infectados, tratados ou não, param de ganhar peso em relação ao grupo controle, e a partir do 8° d.p.i os animais que sobrevivem começam a recuperar o peso, sendo que esta recuperação do peso é mais lenta nos grupos de animais que receberam os IFs, comparado ao controle infectado e tratado com o veículo. O experimento foi repetido para a confirmação dos resultados, sendo que os animais ($n=5$) foram infectados com um inóculo menor do vírus (1×10^3 UFP de SLEV). Os tratamentos com os IFs IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1 ou com o veículo foi o mesmo do experimento anterior. Para avaliar melhor as alterações comportamentais, neurológicas e motoras foi realizado o teste de SHIRPA nos animais no 1°, 3°, 5°, 6°, 7° e 8° d.p.i. Novamente, não houve diferença significativa na curva de sobrevivência. Na determinação da DL50, a infecção com 1×10^3 UFP promoveu a morte de 40% dos animais, no entanto, no experimento com os IFs e com o veículo, novamente a mortalidade foi maior que a esperada, sendo que nos grupos tratados com ambos os IFs nenhum dos animais sobreviveu e no grupo controle infectado e tratado com veículo, apenas um animal sobreviveu.

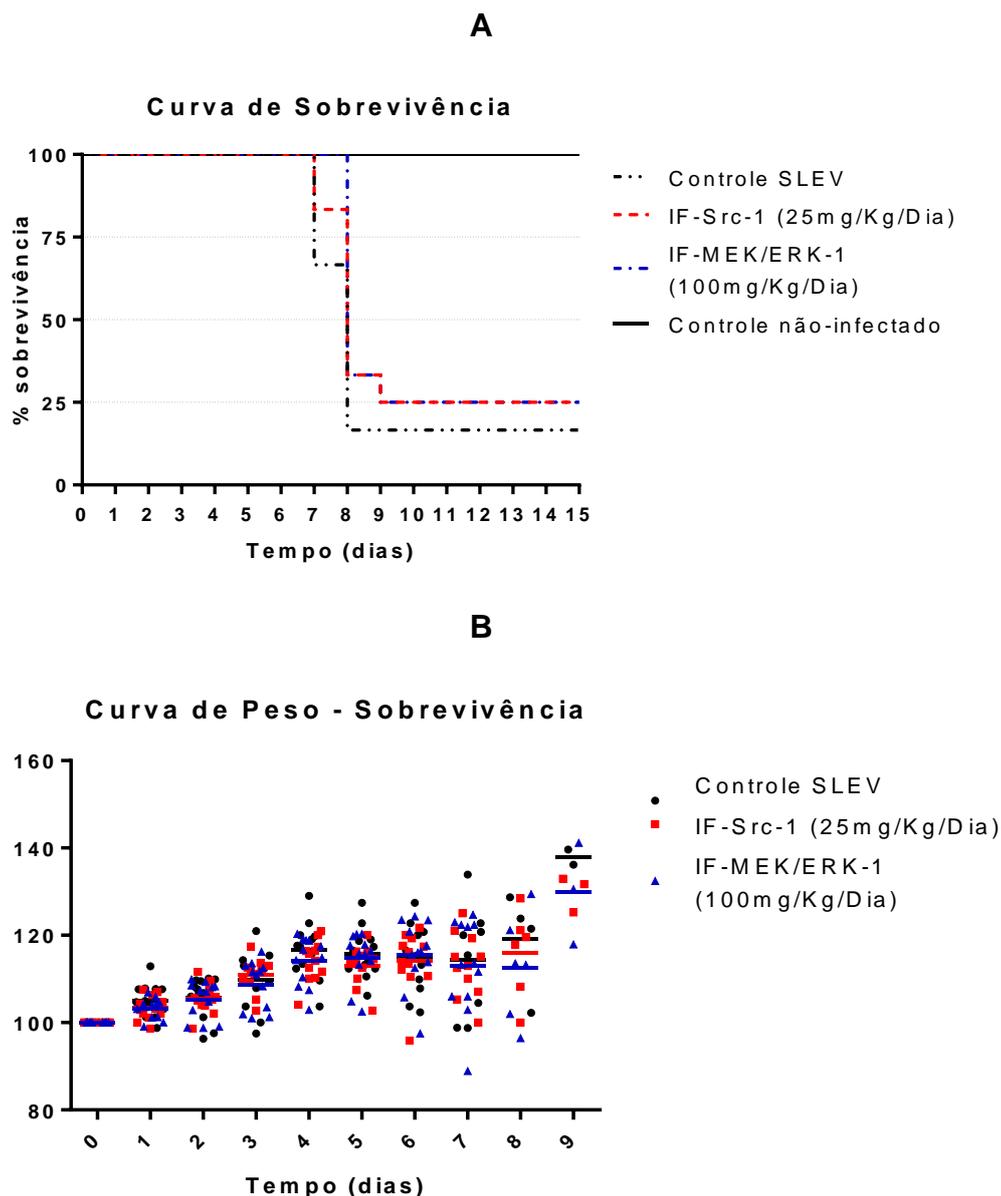
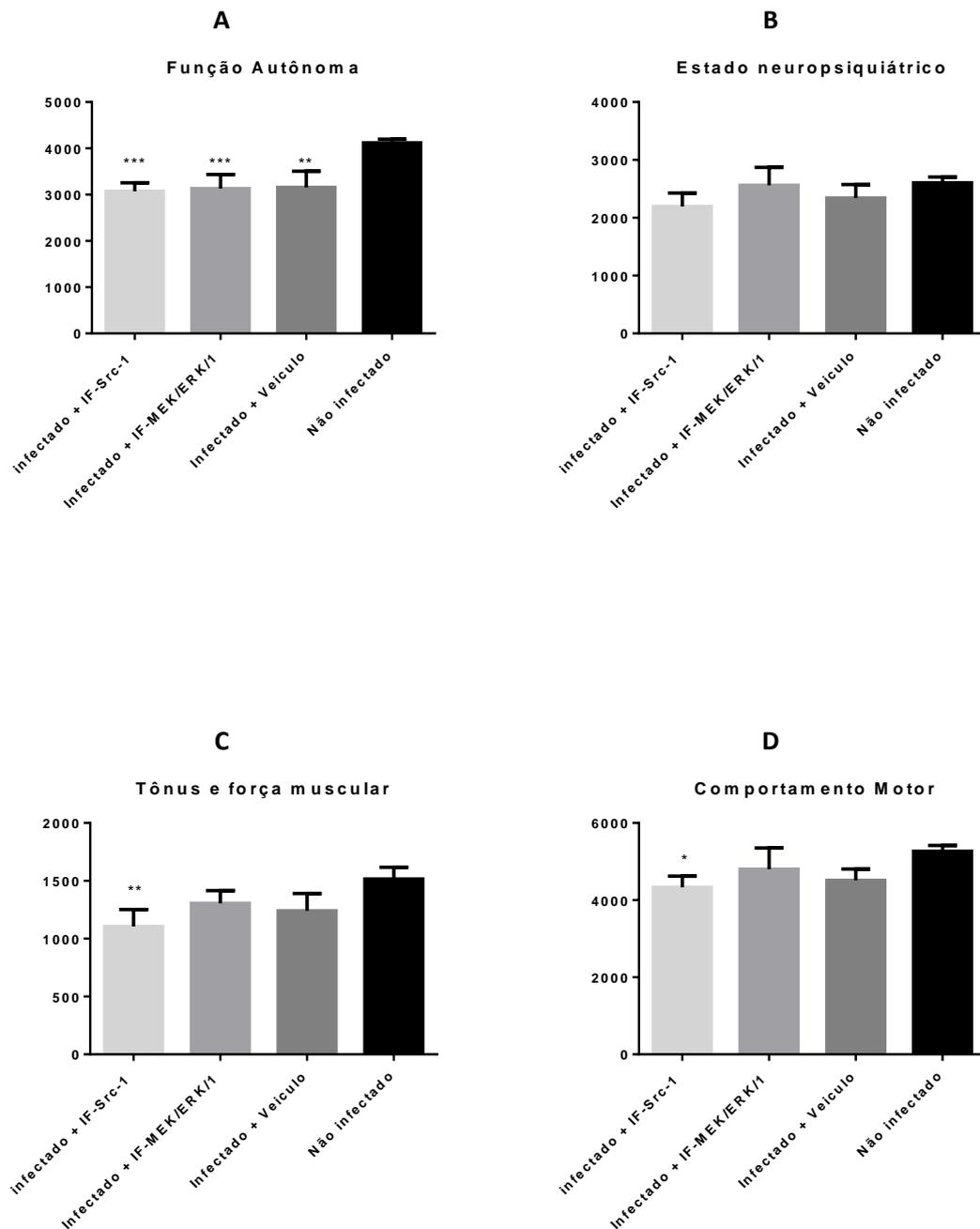


Figura 37: Curva de Sobrevivência (A) e curva de peso (B) animais tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1). Os animais (n=12) foram infectados por via i.p. com 10^4 UFP/animal do SLEV e tratados com os IFs IF-Src-1 (25mg/kg/dia) e IF-MEK/ERK-1 (100mg/Kg/dia) para a determinação da curva de sobrevivência (A) e de peso (B). (* $p < 0.05$ teste LogRank).

5.10.6 Teste SHIRPA

O teste SHIRPA foi realizado para uma melhor avaliação dos sinais clínicos nos animais, como diferenças neurológicas e comportamentais, após a infecção com o SLEV e os tratamentos com os IFs. Este teste possibilita a avaliação de parâmetros como função autônoma, estado neuropsiquiátrico,

tônus e força muscular, comportamento motor e função e reflexo sensorial dos animais. Podemos observar que a infecção com o SLEV altera principalmente as funções autônomas e sensoriais, no entanto, o tratamento com o IF-Src-1 também promoveu alterações no tônus e força muscular e no comportamento motor dos animais (figura 38).



E

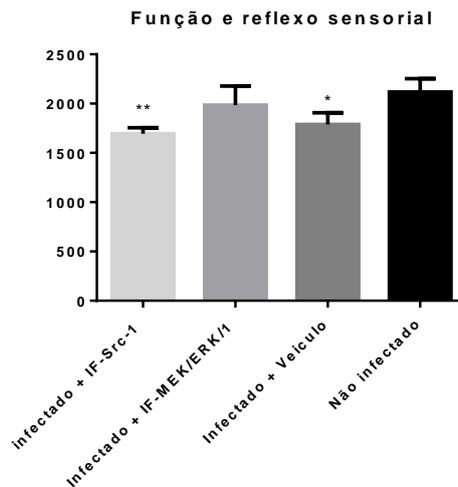


Figura 38: Teste SHIRPA em animais tratados com os IFs de Src e de MEK/ERK. Os animais (n=5) foram infectados ou não (controle) por via i.p. com 10^4 UFP/animal do SLEV e tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1) para a avaliação de diferenças neurológicas e comportamentais após a infecção e os tratamentos. Painel: A - Função autônoma; B – Estado neuropsiquiátrico; C – Tônus e força muscular; D – Comportamento motor; E – Função e reflexo sensorial. (* $P < 0.05$, Two-Way ANOVA Two-tailed (Turkey posttests)).

5.10.7 Histologia dos órgãos

A infecção com o SLEV provocou alterações intestinais significativas nos animais que apresentaram um acúmulo de fezes e uma grande dilatação nos intestinos delgado e grosso, no entanto, interessantemente, em todos os experimentos, os animais tratados com o IF-Src-1 não apresentaram estas alterações (figura 39). Com a finalidade de avaliar se estas manifestações estavam relacionadas à letalidade da infecção, foram realizadas análises histológicas do intestino delgado dos animais e também do cérebro e baço. Em todos os animais (n=3) infectados e tratados ou não com os IFs não foram observadas alterações significativas como necrose, inflamação grave, edema e atrofia severa das microvilosidades digitiformes, que pudessem ocasionar o óbito dos animais. No entanto, na análise do cérebro dos camundongos infectados, foi possível observar a presença de áreas espongiiformes, com degenerações do parênquima cerebral, edema perivascular e infiltrado de

linfócitos perivasculares, além da presença de neurônios necróticos com núcleo picnótico, caracterizando um quadro de encefalite. Estas alterações estavam presentes no grupo controle, assim como, nos grupos tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1). Não sendo possível estimar a atenuação destas alterações no cérebro após os tratamentos com os IFs.



A- IF-Src-1



B- IF-MEK/ERK-1



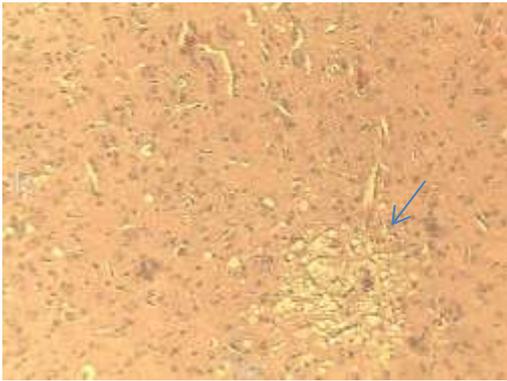
C - IF-Src-2



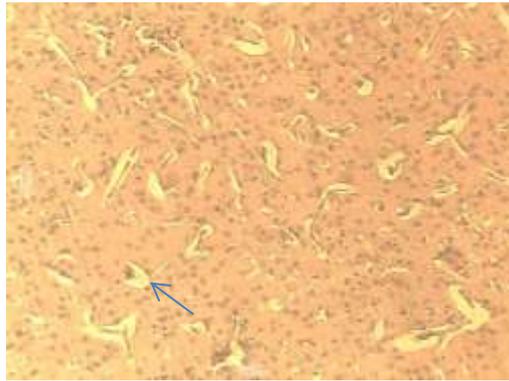
D - Controle-Veículo

Figura 39: Intestino de camundongos infectados e tratados com os IFs. Intestino de animais infectados com 10^4 UFP/SLEV, tratados com os IFs e sacrificados no 7° d.p.i. Painel: A – IF-Src-1, B – IF-MEK/ERK-1, C- IF-Src-2; D – veículo (controle).

A



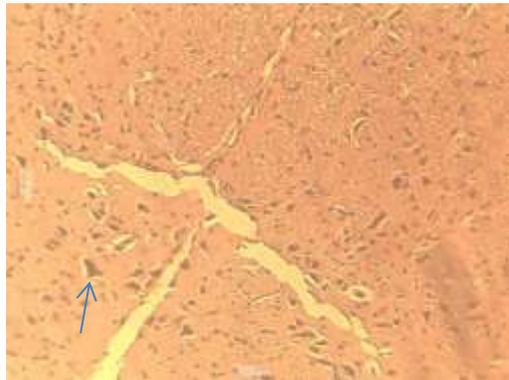
B



C



D



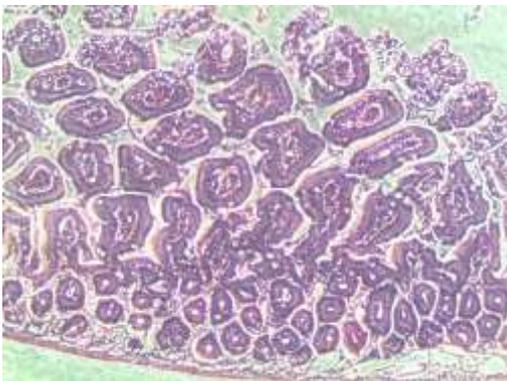
E



F



G



H



I



J



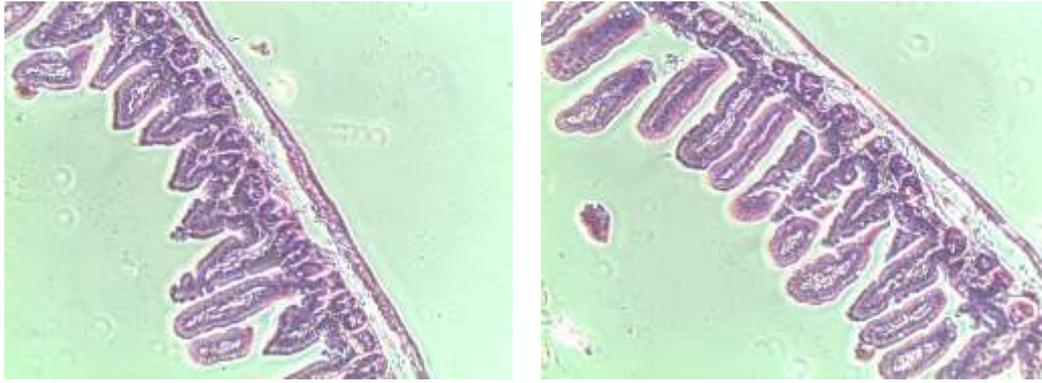


Figura 40: Histologia do cérebro e intestino de animais infectados. Cérebro e intestino de camundongos infectados com 10^4 UFP do SLEV e sacrificados no 7° d.p.i. Caracterização da encefalite no cérebro e de sinais de infecção discreto no intestino, sem a presença de necrose, inflamação, edema ou atrofia severa das vilosidades intestinais. Painel: A - Degenerações caracterizadas por vacuolizações do parênquima cerebral (áreas espongiiformes); B - Edema perivascular; C - Infiltrados de linfócitos perivascular; D - Presença de neurônios picnóticos; E/F - cérebro de animais não infectados; G/H - Intestino de animais infectados apresentando alterações discretas das vilosidades digitiformes. I /J - Intestino de animais não infectados.

6. DISCUSSÃO

Desde a aprovação do primeiro fármaco antiviral, idoxuridina, em 1963, até os dias de hoje, 90 fármacos antivirais já foram formalmente aprovadas para o tratamento de nove doenças infecciosas (*Human immunodeficiency virus* – HIV; *Human betaherpesvirus 5* - HHV-5; *Hepatitis B virus* – HBV; *Hepatitis C virus* – HCV; *Human alphaherpesvirus 1 e 2*– HHV-1/HHV-2; *Influenza A virus*; *Human respiratory syncytial virus* – HRSV; *Human alphaherpesvirus 3* – HHV-3; e *Human papillomavirus*– HPV (CLERQ & LI, 2016).

Estes fármacos podem ser divididos em muitas categorias funcionais: análogos de desoxiuridinas; análogos de nucleosídeos; análogos de pirofosfatos (não nucleosídeos); inibidores de nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTIs); inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTIs); inibidores de proteases (PIs); inibidores da integrase; inibidores da penetração viral; análogos acíclicos da guanosina; fosfonato do nucleosídeo acíclico análogo da adenosina monofosfato; inibidores de NS5A e NS5B - HCV; inibidores de influenza vírus; imunoestimuladores, interferons, inibidores antimetabólicos e de oligonucleotídeos (CLERQ & LI, 2016). No entanto, mesmo diante de todas estas ferramentas e deste conjunto de estratégias antivirais, um grande número de agentes infecciosos emergentes ainda não possuem nenhum tratamento antiviral ou vacinas disponíveis. Dentre estes, podemos destacar a família *Flaviviridae* da qual fazem parte alguns vírus de grande importância em saúde pública como o DENV, YFV, WNV, JEV, Zika vírus, SLEV, entre outros. Embora pequenas moléculas inibidoras (ELSEGINY *et al*, 2014; LIM & PY, 2013) e inibidores de proteínas virais (NS4B e NS5) já terem sido testadas (LIM *et al*, 2015; XIE *et al*, 2015), o desenvolvimento de tratamentos eficazes contra os vírus desta família ainda é um grande desafio.

Neste trabalho utilizamos uma abordagem que visa afetar alvos celulares necessários à multiplicação viral, o que apresenta a vantagem de dificultar enormemente, a geração de variantes virais, tão comum nas abordagens que visam como alvos produtos gênicos virais.

Durante o seu ciclo de multiplicação os vírus utilizam diversos mecanismos celulares para a produção da progênie viral e novas estratégias de tratamento antivirais buscam inibir estas proteínas celulares que são requeridas pelo vírus durante a sua multiplicação. Diversos estudos já confirmaram a importância de proteínas cinases e de algumas vias de sinalização celulares durante a multiplicação de diversos vírus. Um estudo recente mostrou que o tratamento com os IFs Erlotinib e Sunitinib foi capaz de promover um aumento na sobrevivência de camundongos infectados com o DENV e com o vírus Ebola. O alvo primário dos inibidores são tirosinas cinases receptoras (RTKs), no entanto, o seu mecanismo de ação antiviral está relacionado à inibição de um alvo secundário, neste caso, a enzima AAK1 – proteína cinase 1 associada a AP2 (Erlotinib) e a enzima GAK – cinase associada a ciclina G (Sunitinib). AAK1 e GAK regulam a endocitose mediada por receptores e o tráfego pela rede trans-golgi através da fosforilação da subunidade μ das proteínas adaptadoras AP-1 e AP-2, e estas, regulam a formação de vesículas na via secretora e a endocitose na membrana celular (BERKEMAN *et al*, 2017).

Já foi demonstrado também que IFs de tirosinas cinases não receptoras (NRTKs) da família Src e de Abl, também são capazes de promover uma atividade antiviral e estas tirosinas cinases já tiveram seu papel descrito durante o ciclo de multiplicação de diversos vírus (CHENG *et al*, 2015; WISPELAERE *et al*, 2013; CHU & YANG, 2015; HIRSCH *et al*, 2005; MASAKI & SUZUKI, 2015; YAMAUCHI *et al*, 2015). O objetivo deste trabalho foi utilizar os IFs de Src e de Abl, IF-Src-1 e de IF-Src-2, e avaliar o possível efeito antiviral destes durante a infecção com o SLEV *in vitro* e *in vivo*. Estes inibidores já se encontram em teste clínico fases II/III para o tratamento de diferentes tipos de câncer. Ao contrário do câncer, uma doença crônica e de tratamento prolongado, as infecções virais apresentam quadro clínico agudo e conseqüentemente, o tratamento deve ser realizado em um período de semanas. Espera-se que o período de tratamento reduzido para a infecção viral, ocasionará, possivelmente, menos efeitos colaterais quando comparados a um tratamento crônico.

Os resultados dos ensaios de dose-resposta e das curvas de multiplicação demonstram que células BHK-21 infectadas pelo SLEV e tratadas com diferentes concentrações dos inibidores (IF-Src-1, IF-Src-2, IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) exibem uma redução dose-dependente dos títulos de SLEV (Figuras 14 a 17). As curvas de multiplicação do SLEV em baixa M.O.I. (0,01), após o tratamento com o inibidor IF-Src-1, demonstrou uma maior redução nos títulos virais comparado com curvas em uma M.O.I. de 1,0, revelando uma possível atuação do inibidor em uma etapa mais tardia do ciclo de multiplicação, possivelmente na disseminação viral. Um aspecto importante é que os inibidores não apresentam atividade virucida, portanto, a redução nos títulos do SLEV não está relacionada a um efeito direto destes inibidores sobre a partícula viral. Estes resultados evidenciam que a inibição destas fosfotirosinas pode ter um papel importante durante alguma etapa do ciclo de multiplicação do SLEV.

A análise cinética da adição dos inibidores (Src e MEK/ERK) durante o pré-tratamento das células ou durante a adsorção com SLEV demonstrou que nenhum dos IFs foi capaz de promover uma redução no título viral, descartando assim, um possível efeito destes IFs em etapas iniciais do ciclo de multiplicação. Na infecção com o SLEV, observamos que adição do IF-MEK-ERK-2 foi capaz de promover a redução do título viral, mesmo quando adicionado após 12 h.p.i, sendo que, uma maior redução é observada quando o IF foi adicionado durante as primeiras 24 h.p.i. No entanto, esta redução não é observada quando o IF é adicionado após 24 h.p.i. Ao contrário do IF-MEK/ERK-2, a adição dos inibidores de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) 24 horas após o início da infecção apresenta a mesma redução no título viral comparado ao controle, onde o inibidor foi adicionado ao longo de toda a infecção. A adição do IF (IF-Src-1) somente nas primeiras 24 horas de infecção não é capaz de promover a redução do título viral.

Mesmo não sendo possível determinar em qual etapa os IFs de Src estariam atuando, podemos sugerir que os IFs de Src e MEK/ERK, atuam em etapas distintas do ciclo de multiplicação do SLEV. O tratamento de células BHK-21

com os inibidores de Src/Abl (IF-Src-1 e IF-Src-2) não afetaram a fosforilação da via de sinalização de MEK/ERK, reforçando, assim, a especificidade de atuação destes IFs. Estudos estão sendo realizados pelo grupo GTS para investigar a ação antiviral sinérgica destes fármacos, potencializando assim, os seus efeitos antivirais.

Na microscopia eletrônica de transmissão podemos observar que a infecção de células BHK-21 com o SLEV, no tempo de 36 h.p.i., induz alterações celulares características como invaginações do retículo endoplasmático e também a formação de partículas virais envelopadas. Neste tempo de infecção, podemos verificar no controle não tratado a presença de células lisadas com um grande acúmulo de vírions, contidos em vesículas citoplasmáticas. Verificamos também o acúmulo de vesículas vazias uma pequena quantidade de complexos de replicação. A quantificação dos vírions, complexos de replicação e de vesículas vazias em células tratadas os IFs (IF-Src-1, IF-Src-2, IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK-2) revela uma redução no número de partículas virais e uma maior proporção no acúmulo de complexos de replicação em todos os tratamentos, sendo que, este acúmulo foi mais evidente durante o tratamento com o IF (IF-MEK-ERK-2).

Ao contrário do esperado, foi observado que a infecção de células BHK-21 (carenciadas) com o SLEV não promoveu a fosforilação de Src. De fato, durante a infecção mesmo nos tempo de 1, 9, 24 e 48 horas onde a fosforilação de Src é observada no controle (mock), essa ativação não ocorre nas células infectadas. Este resultado sugere que a utilização de IFs de Src, neste caso, poderia ser benéfica ou indiferente à multiplicação viral. Entretanto, os resultados do tratamento com os IFs (IF-Src-1 e IF-Src-2) *in vitro* demonstram que estes reduzem significativamente o título viral. Podemos concluir que a inibição de Src não esta relacionada à redução do título viral, e que provavelmente, nestas concentrações, estes inibidores estejam atuando sobre outras fosfotirosinas responsáveis pelo efeito antiviral observado. WISPELAERE *et al*, 2013, avaliaram o efeito do silenciamento de diversas tirosinas cinases inibidas pelos IFs Dasatinib e AZD0530 através de RNAs de

interferência (RNAi). Os autores demonstraram que a cinase Fyn, um alvo comum dos dois IFs, esta envolvida na replicação do RNA do DENV2 e que provavelmente esta cinase é responsável pela atividade antiviral exercida por estes IFs. O estudo também sugere que o efeito antiviral exercido pelo AZD0530 é provavelmente mediado por um alvo diferente de Src ou Abl.

Outros experimentos, no entanto, precisam ser realizados para elucidar melhor estas observações e avaliar se a inibição de Src também ocorre durante a infecção com outros Flavivírus, e também quais cinases inibidas pelos IFs apresentam algum papel significativo durante a multiplicação viral.

A cinética de fosforilação de MEK/ERK demonstra que o SLEV promove um aumento na fosforilação de ERK1/2 durante os tempos de 30', 1 e 3 h.p.i. comparado ao controle (mock). Provavelmente, o efeito antiviral observado após o tratamento com os IFs de MEK/ERK (IF-MEK-ERK-1 e IF-MEK-ERK-2) esta relacionado à inibição desta via de sinalização. A importância desta via durante a multiplicação de diferentes vírus também já foi descrita (BONJARDIM, 2017). Em um estudo do grupo GTS, ALBARNAZ *et al* (2014), demonstraram que a via de MEK/ERK apresenta um papel decisivo durante a multiplicação do YFV e que o inibidor de MEK1/2 (U0126) é capaz de inibir a multiplicação viral ao afetar três eventos importantes para o sucesso da multiplicação, a acumulação de proteínas não estruturais (NS), rearranjos da membrana e a replicação do genoma viral. Outro estudo realizado pelo grupo, também avaliou o efeito do inibidor de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1) sobre a multiplicação do DENV e demonstrou que esse efeito esta relacionado a um defeito na etapa de morfogênese viral (RIBEIRO, 2015, dados em preparação).

Os resultados obtidos com os IFs "*in vitro*" demonstram que os IFs de Src e de MEK/ERK promovem a redução dos títulos virais do SLEV em células BHK-21 infectadas com o SLEV. No intuito de avaliar se estes IFs também exercem um papel relevante durante a multiplicação viral *in vivo*, estudos foram realizados para avaliar o potencial efeito antiviral destes inibidores em camundongos Balb/c. Os experimentos foram realizados com animais com idade de 17 a 19

dias, infectados por com uma dose letal mediana (LD50) do SLEV por via intraperitoneal (i.p.). Após a infecção os animais foram tratados com os inibidores de Src (IF-Src-1 ou IF-Src-2) ou de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1), que foram administrados por via oral (gavagem), nas concentrações recomendadas pelo fabricante. Os animais controle foram tratados com o mesmo veículo utilizado para a diluição dos inibidores. Neste modelo, foi possível confirmar a infecção viral no cérebro dos animais por RT-PCR em tempo real e por titulação viral, demonstrando, que o vírus consegue se disseminar e, possivelmente, promover um quadro de encefalite nestes animais. De forma geral, com exceção de perda de peso, os animais não aparentam sinais clínicos da infecção até o 6º dia, quando os sinais como prostração, piloereção, fotossensibilidade e arqueamento de dorso se tornam evidentes. O óbito dos animais se inicia no 7º dia podendo ocorrer até o 10º d.p.i. Em todos os experimentos realizados não foram observados sinais de paralisia dos membros inferiores, sendo que apenas dois animais apresentaram este sintoma.

Curvas de sobrevivência dos animais infectados e tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1) foram realizadas para a avaliação da proteção e/ou mortalidade e para a observação dos sinais clínicos após os tratamentos. A infecção dos animais com o SLEV e o tratamento com os IFs ou com o veículo (controle) não reproduziram o resultado esperado de mortalidade, determinado na DL50, ocasionando uma mortalidade maior do que a esperada. Uma possibilidade para o aumento na mortalidade é que a infecção dos animais juntamente com a manipulação durante o procedimento de gavagem e a própria complexidade de interações dos IFs com o hospedeiro, impossíveis de serem reproduzidas *in vitro*, poderiam agravar o quadro clínico dos animais. No entanto, até mesmo no grupo controle, tratado com o veículo, observamos um aumento na proporção da mortalidade. Outra possibilidade seria a dificuldade para a determinação de uma DL50 durante a infecção com alguns flavivírus neurotrópicos. Estudos anteriores já demonstraram a falta de reprodutibilidade para a determinação de uma curva dose-resposta na determinação da DL100 durante a infecção de camundongos com os vírus JEV e WNV, por via

intravenosa (NAGATA *et al*, 2014). Estudos anteriores, também relatam resultados similares após a infecção intraperitoneal ou subcutânea com outros Flavivirus (KING *et al*, 2007; SHRESTHA *et al*, 2006). Estes fatores podem explicar o fato de não ter sido possível reproduzir no grupo controle a mortalidade esperada de aproximadamente 40% dos animais infectados com o inóculo de 10^3 UFP/SLEV, que havia sido testado nos estudos da DL50. No entanto, independente das dificuldades encontradas, o tratamento com nenhum dos IFs foi capaz de proteger os animais da infecção com o SLEV ou de promover uma diferença significativa na sobrevivência dos animais.

A quantificação viral, realizada por RT-qPCR, do cérebro e baço de animais infectados e tratados com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1) também não foi significativa quando comparada ao controle não tratado. Um estudo demonstrou que o IF-Src-1 é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica (BHE) em camundongos C57BL/6 tratados com uma dose de 5mg/Kg/dia, e que este IF apresenta uma meia-vida de 16 horas no cérebro (KAUFMAN *et al*, 2015). No entanto, para evitar a toxicidade associada a danos oculares e no sistema nervoso central, a maioria dos IFs de MEK/ERK são desenvolvidos para não atravessarem a BHE (OPAR, 2012). Na média, mesmo que não significativa, os IFs, IF-Src-1 e IF-MEK/ERK-1, promoveram uma pequena redução da carga viral no cérebro. No entanto, não podemos estabelecer se estes IFs estão exercendo uma atividade antiviral também *in vivo*, pois, devido ao modelo de infecção utilizado, com um vírus neurotrópico, seria importante, primeiramente avaliar se estes IFs são realmente capazes de chegar ao cérebro (MEK e Src), ou se chegam em quantidades satisfatórias para conseguir reduzir a multiplicação viral no local uma vez que a infecção já se instalou (Src). É interessante também avaliar a disseminação do SLEV após os tratamentos, na medula espinhal, sistema nervoso periférico e em outros órgãos, além do baço. A redução viral no cérebro observada com o IF de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1) pode ser um reflexo da redução da disseminação viral sistêmica, já que o tratamento com este IF também promoveu uma pequena redução da carga viral no baço. No estudo de RIBEIRO (2015 - dados em preparação), o tratamento de camundongos AG129 com o IF-MEK/ERK-1

foi capaz de reduzir a mortalidade dos animais infectados com uma dose letal da linhagem D2S20 (DENV-2), esta linhagem mimetiza uma infecção viscerotrópica e neste contexto, a ação deste IF pode ter sido suficiente para controlar a infecção quando comparado ao modelo neurotrópico.

Os vírus neurotrópicos são aqueles capazes de infectar células nervosas. Alguns destes podem ser neuroinvasivos, ou seja, capazes de infectar o Sistema Nervoso Central (SNC), através, por exemplo, da disseminação no sistema nervoso periférico. Estes vírus podem ser também neurovirulentos, e neste caso, serem capazes de ocasionar uma doença no SNC (GIORGIO *et al*, 2015). Diversos vírus são classificados como neurotrópicos, incluindo o SLEV, no entanto, somente os vírus da família *Herpesviridae* e o vírus JC (*John Cunningham vírus*; família *Polyomaviridae*) são estudados em relação ao seu neurotropismo entérico. Estes vírus podem ocasionar uma condição denominada pseudo-obstrução intestinal crônica idiopática (POIC) que pode alterar a atividade peristáltica normal, através da infecção do aparelho neuromuscular entérico (GIORGIO *et al*, 2015). Estudos demonstram que animais infectados com outros flavivírus neurotrópicos (TBEV e WNV) apresentam também alterações no intestino caracterizadas como um acúmulo de fezes, possivelmente, pela perda da motilidade intestinal (NAGATA *et al*, 2015).

Nos experimentos realizados com o SLEV, foi possível observar que os animais infectados apresentavam alterações significativas no intestino delgado e grosso, com dilatações e um grande acúmulo de fezes. Interessantemente, aproximadamente 75% dos animais tratados com o IF de Src (IF-Src-1) não apresentaram este sinal clínico característico da infecção. Este IF, possivelmente, promoveu uma melhora neste aspecto da infecção entérica. Para avaliar se estas alterações no intestino dos animais infectados eram significativas ao ponto de promoverem uma insuficiência intestinal e contribuírem para a letalidade da doença, foram realizadas análises histopatológicas do intestino delgado, e também do cérebro e baço, dos animais infectados para a avaliação morfológica.

A análise histológica do intestino de todos os camundongos infectados com o SLEV, tratados ou não com os IFs (IF-Src-1 e IF-MEK-ERK-1), demonstra que as alterações intestinais observadas não foram relevantes o suficiente para provocar a mortalidade dos animais, este fato pode explicar porque, mesmo promovendo a melhora neste aspecto clínico, o tratamento com o IF-Src-1 não foi capaz de reduzir a mortalidade dos animais. Provavelmente, os animais estão sendo levados ao óbito por outras sequelas provocadas pela infecção do sistema nervoso, como a própria encefalite, por exemplo. Na histologia do cérebro dos animais infectados foi possível observar focos de degenerações, grandes regiões com edema perivascular, infiltrados de de linfócitos e presença de neurônios picnóticos. Estas alterações caracterizam um quadro de encefalite nestes animais, no entanto, devido ao processamento de algumas amostras, o número de lâminas avaliadas não foram suficientes para estabelecer se o tratamento com os IFs promoveu a atenuação nestas alterações morfológicas no cérebro. Contudo, foi possível verificar nas lâminas examinadas, que os animais tratados com os IFs também apresentavam um quadro de encefalite.

Não foi possível observar sinais de toxicidade nos animais não infectados e tratados com os IFS nas concentrações testadas. Entretanto, mesmo que utilizados por um curto período de tempo, estes IFs podem ter promovido alguns efeitos adversos que não foram observados nos animais, ressaltando que se trata de animais novos com idade entre 17 e 19 dias. O resultado do teste SHIRPA demonstra que o IF-Src-1 promoveu uma piora no comportamento motor, tônus e força muscular, função autônoma e função reflexo sensorial comparado ao controle infectado e tratado somente com o veículo. Mesmo promovendo a melhora em alguns aspectos clínicos da infecção como a melhora da motilidade intestinal e também uma pequena redução da carga viral no cérebro dos animais, o IF-Src-1, na concentração utilizada, promove a piora dos animais nos aspectos avaliados no SHIRPA. Portanto, é necessário avaliar se esta piora pode propiciar o agravamento da doença provocada pela infecção viral, e também, se a utilização de outro

modelo animal, com animais mais velhos, ou de diferentes concentrações do IF poderiam reduzir estes efeitos adversos.

7. CONCLUSÕES/PERSPECTIVAS

Podemos concluir que o tratamento com os IFs de Src (IF-Src-1 e IF-Src-2) e de MEK/ERK (IF-MEK/ERK-1 e IF-MEK/ERK/2) promovem uma redução considerável no título viral ($=$ ou $>$ 1 log) e que estes inibidores atuam em etapas distintas da multiplicação viral. A ineficácia dos inibidores *in vivo* pode estar relacionada ao neurotropismo do SLEV, pois, não foi possível avaliar se os IFs são capazes de cruzar a BHE em concentrações necessárias para exercerem a atividade antiviral observada *in vitro*. No entanto, a complexidade das interações vírus-hospedeiro e também fármaco-hospedeiro dificultam a antecipação de conclusões sobre o efeito antiviral dos IFs de Src e MEK/ERK *in vivo*, já que, nem o tratamento com o IF de MEK/ERK, o qual, sabidamente possui atividade antiviral contra o DENV, foi capaz de conferir proteção aos animais infectados com o SLEV. Novos experimentos com a administração dos IFs em outros modelos animais, utilizando vírus não neurotrópicos, que podem, talvez, ser mais susceptíveis ao efeito dos IFs, permitiriam uma melhor avaliação da eficácia dos IFs de Src *in vivo*. No caso da infecção com o SLEV, podemos afirmar que as concentrações testadas não tiveram nenhum efeito antiviral significativo, com exceção, da melhora na obstrução intestinal dos animais tratados com o IF-Src-1. É importante também determinar a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α ; IL12; IL-1 β ; IFN- γ), anti-inflamatórias (IL-4; IL-10) e antivirais (IFN- α e IFN- β), durante a infecção com o SLEV e o tratamento com os IFs. O mecanismo de ação dos IFs de Src também precisa ser investigado, já que a inibição de Src não é responsável pela atividade antiviral e alvos secundários destes IFs podem estar exercendo este papel. A identificação destes alvos secundários pode ser importante para corroborar dados de outros estudos ou também para identificar novos alvos antivirais contra a família *Flaviviridae*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albarnaz JD, Oliveira LC, Torres AA, Palhares RM, Casteluber MC, Rodrigues CM, Cardozo PL, Souza AMR, Pacca CC, Ferreira PCP, Kroon EG, Nogueira ML, Bonjardim CA. (2014). MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: Implication as an antiviral therapeutic target. *Antiviral Research*. 111:82-92.

Alberts Bruce, *et al.* *Biologia Molecular da Célula* [recurso eletrônico]. Tradução Ana Letícia Vanz, *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2010. 5ªed:7880p.

Andersen AA, Hanson RP. (1974). Influence of sex and age on natural resistance to St. Louis encephalitis virus infection in mice. *Infect Immunity*. 9: 1123-1125.

Andrade AA, Silva PN, Pereira AC, De Sousa LP, Ferreira PC, Gazzinelli RT, Kroon EG, Ropert C, Bonjardim CA. (2004). The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J*. 381(2):437-46.

Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. (2009). Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J. Virol*. 83(24):12895.

Bacarizo J, Martínez-Rodríguez S, Cámara-Artigas A. (2014). Structure of the c-Src-SH3 domain in complex with a proline-rich motif of NS5A protein from the hepatitis C virus. *Journal of Structural Biology*. 189: 67–72.

Bekerman E; Neveu G, Shulla A, Branna J, *et al.* (2017). Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. *The Journal of Clinical Investigation*. 1-15.

Bertoletti F, Crespan E, Maga G. (2012). Tyrosine kinases as essential cellular cofactors and potential therapeutic targets for human immunodeficiency virus infection. *Cell. Mol. Biol.* 58 (1): 31-43.

Bolen JB, Thiele CJ, Israel MA, Yonemoto W, Lipsich LA, Brugge JS. (1984). Enhancement of Cellular src Gene Product Associate Tyrosyl Kinase Activity Following Polyoma Virus Infection and Transformation. *Cell.* 38: 767-777.

Bonjardim, CA. (2016). Viral exploitation of the MEK/ERK pathway – A tale of vaccinia virus and other viruses. *Virology.*

Bowen GS, Monath TP, Kemp GE, Kershner JH, Kirk LJ. (1980). Geographic variation among St. Louis encephalitis virus strains in the viremic responses of avian hosts. *Am J Trop Med Hyg.* 29: 1411-1419.

Brinton MA, Dispoto JH. (1988). Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of Flavivirus genome RNA. *Virology.* 162(2):290-9.

Brooks SP & Dunnett SB. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews/Neuroscience.* 10:519-529.

Brown M, Cooper J. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta.* 1287: 121-49.

Burke DS, Monath TP. (2001). Flaviviruses. In *Field's Virology.* 40:1043-1125.

Cargnello M, Roux PP. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 75(1):50–83.

Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP. (2008). The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front. Biosci.* 13:4258-75.

Ceballos-Olvera I, Chávez-Salinas S, Medina F, Ludert JE, del Angel RM. (2010). JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. *Virology*. 396(1):30-6.

Centers for Disease Control and Prevention. (2017). St. Louis Encephalitis. Technical fact sheet. Disponible em: <http://www.cdc.gov/sle/technical/epi.html>

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Micro*. 44:649-688.

Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. (1997). RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5 and 3'-noncoding regions of Japanese encephalites virus genomic RNA. *J Virol*. 71(5):3466-73.

Cheng CY, Huang WR, Chi PI, Chiu HC, Liu HJ. (2015). Cell entry of bovine ephemeral fever virus requires activation of Src-JNK-AP1 and PI3K-Akt-NF-κB pathways as well as Cox-2-mediated PGE2/EP receptor signalling to enhance clathrin-mediated virus endocytosis. *Cellular Microbiology*. 17(7):967–987

Chu JJ & Yang PL. (2007). c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 104: 3520–3525.

Clercq E, Guangdi li. (2016). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Rewiews*. 29(3):695-747.

Cowan KJ, Storey BK. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of Experimental Biology*. 206:1107-15.

Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, *et al.* (1998). Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*. 246(2):409–417.

Das S, Chakraborty S, Basu A. (2010). Critical role of lipid rafts in virus entry and activation of phosphoinositide 3' kinase/Akt signaling during early stages of Japanese encephalitis virus infection in neural stem/preoxygenator cells. *Journal of Neurochemistry*. 115:537-549.

Day JF. (2001). Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: lessons from recent, and not so recent, outbreaks. *Annu Rev Entomol*. 46:111-138.

de Magalhães JC, Andrade AA, Silva PN, Sousa LP, Ropert C, Ferreira PC, Kroon EG, Gazzinelli RT, Bonjardim CA. (2001). A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J. Biol. Chem*. 276:38353–38360.

Deas TS, Binduga-Gajewska I, Tilgner M, Ren P, Stein DA, Moulton HM, Iversan PL, Kauffman EB, Kramer LD, Shi PY. (2005). Inhibition of flavivirus infection by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *J Virol*. 79(8):4599-609.

Dégallier *et al.* (1992). As Aves como Hospedeiras de Arbovírus na Amazônia Brasileira. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi*. 8(1).

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 26(22):3279–90.

Diao L, Zhang B, Xuan C, Sun S, Yang K, Tang Y, Qiao W, Chen Q, Geng Y, Wang C. (2005). Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by HSV-1 immediate early protein ICP0. *Exp. Cell Res*. 308:196–210.

Diaz LA, Re V, Almiron WR, *et al.* (2006). Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis*. 12(11): 1752-1754.

dos Santos CLS, Sallum MAM, Franco HM, Oshiro FM, and Rocco IM. (2006). Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro.* 101(1): 57-63.

Elseginy SA, Massarotti A, Nawwar GA, Amin KM, Brancale A. (2014). Small molecule inhibitors of West Nile virus. *Antivir Chem Chemother.* 23:179 –187.

Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai C J. (1990). Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 64(9):4356–4363.

Falgout B, Pethel M, Zhang Y-M, *et al.* (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* 65:2467–2475.

Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. (2009). Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe.* 5: 318-328.

Figueiredo LTM. (2000). The brazilian flavivirus. *Microbes and infection.* 2(9):1643-49.

Figueiredo LTM. (2007). Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 40(2):224-229.

Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol.* 82(8):1867-76.

Gorbunova EE, Gavrillovskaya IN, Pepini T, Mackow ER. (2010). VEGFR2 and Src Kinase Inhibitors Suppress Andes Virus-Induced Endothelial Cell Permeability. *Journal of Virology.* 85(5): 2296–2303.

Green TP, Fennell M, Whittaker R, Curwen J, Jacobs V, Allen J, Logie A, Hargreaves J, Hickinson DM, Wilkinson RW, Elvin P, Boyer B, Carragher N, Plé PA, Bermingham A, Holdgate GA, Ward WHJ, Hennequin LF, Davies BR, Costello GF. (2009). Preclinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530. *Molecular Oncology*. 3(3):248-261.

Gubler DJ, Kuno G, Markoff L. (2007). Flaviviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P.M. (Ed.). *Fields Virology*. 2.

Hargett D, Rice S, Bachenheimer SL. (2006). Herpes simplex virus type 1 ICP27-dependent activation of NF κ B. *J. Virol*. 80:10565–578.

Hirsch AJ, Medigeshi GR, Meyers HL, DeFilippis V, Fruh K, Briese T, Lipkin WI, Nelson JA. (2005). The Src family kinase c-Yes is required for maturation of West Nile virus particles. *J. Virol*. 79:11943–11951.

Holden KL, Sten DA, Pierson TC, Ahmed AA, Clyde K, Iversen PL, Harris E. (2006). Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology*. 344(2):439-52.

Holloway G, Coulson BS. (2006). Rotavirus activates JNK and p38 signaling pathways in intestinal cells leading to AP-1-driven transcriptional responses and enhanced virus replication. *J. Virol*. 80:10624–633.

Hubbard SR & Till JH. (2000). Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem*. 69:373–98.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>.

Jacobs SC, Stephenson JR, Wilkinson GW. (1992). High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: Protection elicited in a murine model. *J. Virol.* 66(4):2086–2095.

Kaufman AC, Salazar SV, Haas LT, Yang J, Kostylev MA, Jeng AT, Robinson SA, Gunther EC, van Dyck CH, Nygaard HB, Strittmatter SM, MD. (2015). Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice: Fyn Inhibition by AZD0530. *Annals of Neurology.* 77(6):953-971.

King NJ, Getts DR, Getts MT, *et al.* (2007). Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol Cell Biol.* 85:33-42.

Klein NP, Bouchard MJ, Wang LH, Kobarg C, Schneider RJ. (1999). Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *The EMBO Journal* 18: 5019–5027.

Kramer LD, Chandler LJ. (2001). Phylogenic Analysis of the Envelope Gene of St. Louis Encephalitis Virus. *Arch Virol.* 146:2341-2355.

Leslie T, Webster MD. (1938). Immunity of mice following subcutaneous vaccination with ST. Louis encephalitis virus. *Rockefeller Institute of Medical Research.* 111-124.

Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science.* 319(5871):1830-4.

Liang Y & Roizman B. (2006). State and Role of Src Family Kinases in Replication of Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Virology.* 80(7): 3349–3359.

Lim SP, Noble CG, Shi PY. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 119:57– 67.

Lim SP, Shi PY. (2013). West Nile virus drug discovery. *Viruses*. 5:2977– 3006.

Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY. (1998). DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J. Virol.* 72(1):191–200.

Lindenbach BD, Rice CM. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 59:23–61.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*. 5:33.

Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. (1996). Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 220:232–240.

Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, *et al.* (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 245(2):203–215.

Mahmood F, Chiles RE, Fang Y, Barker CM, Reisen WK (2004). Role of nestling mourning doves and house finches as amplifying hosts of St. Louis encephalitis virus. *J Med Entomol.* 41: 965-972.

Markoff L. (2003). 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res.* 59:177-228.

Masaki T & Suzuki T. (2015). NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. *Future Virol.* 10(6): 751–762.

McCarthy SDS, Jung D, Sakac D, Branch DR. (2014). c-Src and Pyk2 Protein Tyrosine Kinases Play Protective Roles in Early HIV-1 Infection of CD4+ T-Cell Lines. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 66(2):118-126.

McLean TI, Bachenheimer SL. (1999). Activation of cJUN N-terminal kinase by herpes simplex virus type 1 enhances viral replication. *J. Virol.* 73:8415–26.

Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 nonstructural protein 4B. *J Biol Chem.* 281(13):8854–8863.

Ministério da Saúde. (2006). Investigação de surto de doença febril aguda, envolvendo casos de encefalite, de provável etiologia viral (Saint Louis), São José do Rio Preto – SP, setembro de 2006. Secretária de Vigilância em Saúde. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_stlouis_03_101.pdf>

Monath TP, Cropp CB, Bowen GS, *et al.* (1980). Variation in Virulence for Mice and Rhesus Monkeys Among St. Louis Encephalitis Virus Strains of Different Origin. *Am J Trop Med Hyg.* 29(5): 948-962.

Mondini A, Bronzoni R, Cardeal I, Santos T, Lázaro E, Nunes S, Silva G, Madrid M, Rahal P, Figueiredo L. (2007). Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J. Clin. Virol.* 40:84–86.

Morrison, Deborah K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a011254.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 3(1):13-22.

Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H. (2015). The

Pathogenesis of 3 neurotropic Flaviviruses in a mouse model depends on the route of neuroinvasion after viremia. *J Neuropathol Exp Neurol* . 74(3): 250-260.

Naranatt PP, Akula SM, Zien CA, Krishnan HH, Chandran B. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *J Virol*. 77(2):1524-39.

O'leary JL, Smith MG, Reames HR. (1941). Influence of age on susceptibility of mice to ST. Louis encephalitis virus and on the distribution of lesions. 233-245.

Okada M. (2012). Regulation of the Src Family Kinases by Csk. *Int. J. Biol. Sci.* 8(10):1385-1397.

Oneyama C, Iino T, Saito K, Suzuki K, Ogawa A, Okada M. (2009). Transforming potential of Src family kinases is limited by the cholesterol-enriched membrane microdomain. *Mol Cell Biol*. 29: 6462-72.

Opar, Alisa. (2012). New class of kinase inhibitors poised to join the anticancer arsenal. *Nature Reviews/Drug Discovery*. 11:819-820.

Pagano MA, Tibaldi E, Palù G, Brunati AM. (2013). Viral proteins and Src family kinases: Mechanisms of pathogenicity from a "liaison dangereuse". *World J Virol*. 2(2): 71-78.

Pastorino B, Nougairède A, Wurtzb N, Goulda N, Lamballerie X. (2010). Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Research*. 87:281–294.

Pauvolid-Corrêa A, Tavares FN, Costa EV, Burlandy FM, Murta M, Pellegrin AO, Nogueira MF, Silva EE. (2010). 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(6): 829-833.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22(2):153-83.

Pereira ACTC, Soares-Martins JAP, Leite FGG, da Cruz AFP, Torres AA, *et al.* (2012). SP600125 inhibits Orthopoxviruses replication in a JNK1/2 - independent manner: Implication as a potential antipoxviral. *Antiviral Res.* 93:69-77.

Pfannkuche A, Buther K, Karthe J, Poenisch M, Bartenschlager R, Trilling M, Hengel H, Willbold D, Haussinger D, Bode JG. (2011). c-Src Is Required for Complex Formation Between the Hepatitis C Virus–Encoded Proteins NS5A and NS5B: A Prerequisite for Replication. *Hepatology.* 53(4): 1127-1136.

Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa APA, Leite OF. (1981). Isolation from St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:145–148.

Qin D, Feng N, Fan W, Ma X, Yan Q, Lv Z, Zeng Y, Zhu J, Lu C. (2011). Activation of PI3K/AKT and ERK MAPK signal pathways is required for the induction of lytic cycle replication of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus by herpes simplex virus type 1. *BMC Microbiol.* 11:240.

Raman M, Chen W, Cobb MH. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26:3100-12.

Raung SL, Chena SY, Liao SL, Chenb JH, Chen CJ. (2007). Japanese encephalitis virus infection stimulates Src tyrosine kinase in neuron/glia. *Neuroscience Letters.* 419: 263–268.

Reisen WK. (2003). Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res* 61: 139-183.

Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. *Nature*. 375(25): 291-8.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, *et al.* (1985). Nucleotide sequence of Yellow Fever Virus: implications for Flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 229:726-733.

Rivalora ME, Tauro LB, Llinas GA, Contigiani MS. (2014). virulence variation among epidemic and non-epidemic strains of saint Louis encephalitis virus circulating in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]*. 109(2).

Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, *et al.* (2005). St. Louis Encephalitis Virus: first isolation from a human in Sao Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 47(5): 281-285.

Rodrigues SG, Nunes MR, Casseb SM, Prazeres AS, Rodrigues DS, Silva MO, Cruz AC, Tavares-Neto JC, Vasconcelos PF. (2010). Molecular Epidemiology of Saint Louis Encephalitis Virus in the Brazilian Amazon: Genetic Divergence and Dispersal. *Journal of General Virology*. 91: 2420-2427.

Rodrigues, Sueli Guerreiro *et al.* (2010). Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. *Rev Pan-Amaz Saude*. 1(1):81-86.

Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MRQ, Teixeira MM, Paixão TA, Santos RL. (2013). Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(11): e2537.

Roskoski RJr. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 331: 1-14.

Rovedo M & Longnecker R. (2008). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Preferentially Signals through the Src Family Kinase Lyn. *Journal of Virology.* 82(17): 8520–8528.

Schlesinger JJ, Foltzer M, Chapman S. (1993). The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology.* 192(1):132–141.

Shapiro L, Heidenreich KA, Meintzer MK, Dinarello CA. (1998). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in HIV type 1 production in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7422–26.

Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, Kaneko S, Shimotohno K, Murakami S. (2004). Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol.* 78(6): 2738-48.

Shrestha B, Wang T, Samuel MA, *et al.* (2006). Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J Virol.* 80:5338-48.

Si X, Luo H, Morgan A, Zhang J, Wong J, Yuan J, Esfandiarei M, Gao G, Cheung C, McManus BM. (2005). Stress-activated protein kinases are involved in coxsackievirus B3 viral progeny release. *J. Virol.* 79:13875–881.

Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB, Pinto AC. (2009). Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim. Nova.* 32(2): 453-462.

Silva PN, Soares JÁ, Brasil BS, Nogueira SV, Andrade AA, de Magalhães JC, Bonjardim MB, Ferreira PC, Kroon EG, Bruna-Romero O, Bonjardim CA. (2006). Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J.* 398(1):83-95.

Slavim Howard B. (1942). Persistence of the virus ST. Louis encephalitis in the central nervous system of mice for over five months. University of Rochester, School of Medicine and Dentistry. 113-116.

Spinsanti L, Basquiera AL, Bulacio S, *et al.* (2003). St. Louis Encephalitis in Argentina: the first case reported in the last seventeen years. *Emerg Infect Dis.* 9(2): 271-273.

Sun B, Harrowe G, Reinhard C, Yoshihara C, Chu K, Zhuo S. (2001). Modulation of human cytomegalovirus immediate-early gene enhancer by mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1. *J Cell Biochem.* 83(4):563-73.

Taylor SS & Kornev AP. (2011). Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins. *Trends Biochem Sci.* 36(2): 65–77.

Terzian ACB, Mondini A. *et al.* (2011). Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(3).

Trent DW, Grant JA, Vorndam AV, Monath TP. (1981). Genetic Heterogeneity Among Saint Louis Encephalitis Virus Isolates of Different Geographic Origin. *Virology.* 114:319-332.

Trent DW, Monath TP, Bowen GS, *et al.* (1980). Variation Among Strains of St. Louis Encephalitis Virus: Basis for a Genetic, Pathogenic, and Epidemiologic Classification. *Ann NY Acad Sci.* 354:219-237.

Tsai TF, Mitchell CJ. (1986). St. Louis encephalitis. In: Monath TP, ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Boca Raton, CRC Press. 4:113-143.

Umareddy, I., Chao, A., Sampath, A., Gu, F. & Vasudevan, S. G. (2006). Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 87:2605–2614.

Vedovello D, Drumond BP, Marques RE, Ullmann LS, Fávaro EA, Terzian ACB, Figueiredo LTM, Teixeira MM, Araújo JP Jr, Nogueira ML. (2015). First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. *Archives of Virology.* 160(5): 1189-1195.

Wagner MJ & Smiley JR. (2011). Herpes Simplex Virus Requires VP11/12 To Activate Src Family Kinase-Phosphoinositide 3-Kinase-Akt Signaling. *Journal of Virology.* 85(6): 2803–2812.

Wei L, Zhu Z, Wang J, Liu J. (2009). JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways contribute to porcine circovirus type 2 infection. *J. Virol.* 83:6039–47.

Wengler G, Gross HJ. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with Flaviviruses. *Virology.* 89(2):423-37.

Wispelaere M, LaCroix AJ, Yang PL. (2013). The Small Molecules AZD0530 and Dasatinib Inhibit Dengue Virus RNA Replication via Fyn Kinase. *Journal of Virology.* 87(13): 7367–7381.

Xie X, Zou J, Wang QY, Shi PY. (2015). Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Res.* 118:39 – 45.

Yamauchi S, Takeuchi K, Chihara K, Sun X, Honjoh C, Yoshiki H, Hotta H, Sada K. (2015). Hepatitis C Virus Particle Assembly Involves Phosphorylation of NS5A by the c-Abl Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* 290: 21857-21864.

Yon C, Teramoto T, Mueller N, *et al.* (2005). Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 280(29):27412–27419.

Zhang J, Yang PL, Gray NS. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer.* 9: 28-39.

Zhu X, Zhou F, Qin D, Zeng Y, Lv Z, Yao S, Lu C. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 induces lytic cycle replication of Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus: role of Ras/c-Raf/MEK1/2, PI3K/AKT, and NF- κ B signaling pathways. *J Mol Biol.* 410(5):1035-51.

9. Anexo:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 94 / 2016, relativo ao projeto intitulado “UTILIZAÇÃO DOS INIBIDORES FARMACOLÓGICOS COMO ANTIVIRAIS NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS PELO VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS (SLEV)”, que tem como responsável Cláudio Antonio Bonjardim, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 21/06/2016. Este certificado espira-se em 21/06/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 94 / 2016, related to the Project entitled “USE OF PHARMACOLOGICAL INHIBITORS AS ANTIVIRAL IN THE TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED BY SAINT LOUIS ENCEPHALITIS VIRUS (SLEV)”, under the supervision of Cláudio Antonio Bonjardim, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 21/06/2016. This certificate expires in 21/06/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 21/06/2016.
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br