

MARIANA BARATA VIANA TIRADENTES

Caracterização histopatológica da infecção pelo vírus da Febre Amarela (PR4408) em Hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*)



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO/2023

**Trabalho realizado no Laboratório de Medicina Experimental e Saúde (IOC/FIOCRUZ) sob a orientação do Doutor Pedro Paulo de Abreu Manso, co-orientação de Fernanda de Oliveira Bottino e tutorado por Luciana Jesus Costa do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ.**

## Agradecimentos

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a minha família, em especial ao meu pai e a minha avó que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu tivesse uma boa educação. Sempre me incentivaram a estudar e a correr atrás dos meus sonhos, sejam eles quais forem. Se hoje eu tenho isso tudo, é por causa deles que sempre apoiaram todas as minhas decisões e sempre cuidaram de mim com muito amor e carinho. Fico muito feliz em poder dar orgulho a essa família.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Pedro Paulo de Abreu Manso por ter me dado essa imensa oportunidade de fazer parte dessa família linda que é o Laboratório de Medicina Experimental e Saúde e também por fazer parte desse projeto incrível. Obrigada por todas as horas em frente ao microscópio (que foram muitas), por todos os conselhos, todas as vezes que ficamos até tarde, feriados e finais de semanas em experimentos, por ensinamentos que vão muito além do laboratório e, principalmente, por acreditar que eu era capaz de desenvolver tanto dentro da pesquisa. Obrigada por me ensinar tanto da histopatologia e por ter me encantado dentro desse mundo. E eu também não poderia esquecer de agradecer por me proporcionar tanta cultura musical que eu adquiri nesse tempo!

Também não poderia deixar de falar da minha co-orientadora, que posso também chamar de amiga. Minha dupla, minha parceira, meu apoio. Espero que a sua experiência tendo eu como sua primeira IC tenha sido gratificante e inesquecível. Obrigada por me acudir em momentos de socorro, nos abraços em momentos de apertos e sorrisos em momentos de alegria. Fui feliz demais sendo orientada por você e espero que você também tenha esse sentimento. Você é meu exemplo de organização, determinação e força. Amei fazer parte desse projeto com você e contribuir com meu melhor. Obrigada também por acreditar e me encarregar de funções tão importantes.

Este parágrafo é dedicado aos meus amigos de laboratório. Gostaria de agradecer a Gabriela Cardoso, Milla Paiva e Bruno Marques, que sempre se preocuparam comigo, me incentivavam quando eu precisava, me davam esporro também quando eu precisava, mas sempre pensando no meu bem, me ajudavam em momentos de socorro e vibravam como ninguém nos momentos de vitória e me abraçavam em momentos de derrota. Muito obrigada! Gostaria também de agradecer ao João Paulo Rodrigues, mais conhecido como JP, que definitivamente foi a pessoa que mais me salvou, mais me cobriu quando eu estava em apuros,

assim como foi meu ouvinte em momentos difíceis e meu fiel escudeiro. Nunca esquecerei as vezes que você me cobriu para que eu pudesse almoçar, ir para a aula ou quando você passava do seu horário apenas para me ajudar ou para que eu não ficasse sozinha. Muito obrigada mesmo!

Gostaria de agradecer às minhas amigas Lívia Pozzi, Gabriela Lisboa e Fabiane Messner que acompanharam pessoalmente como que esse ano foi absurdamente difícil para mim por diversas questões. Elas que nunca me deixaram sozinha, independente de qualquer coisa, sempre me escutaram, me apoiaram, me ajudaram no amadurecimento e a ser uma pessoa melhor. Lívia sempre tão prestativa, chegou a se voluntariar a me ajudar a escrever, fazer imagens, procurar referências e o que mais fosse preciso, assim como sempre tentava procurar ver o lado bom da vida, mesmo quando a minha estava obscura. Essa menina acredita e aposta todas as suas fichas em mim, sem titubear. A nossa parceria na faculdade com certeza fez com que a vida fosse mais leve e alegre. Obrigada por fazer parte da minha vida. Gabi, sempre muito conselheira, sempre me preocupava, não me deixava cair em tentação e me entendia como ninguém. Dentro do jeitinho agressivo, era uma amiga super presente e capaz de lutar contra todos pra defender quem ela ama. Fabi sempre trazia a ternura e o carinho nas suas palavras e ações, que me reconfortavam de forma tão calorosa e sempre me dava forças a continuar, uma amiga fiel e leal. Fico feliz demais que nossa amizade se estreitou e a nossa conexão se estendeu para além dos prédios do CCS.

À minha amiga Johari Chequer, obrigada por me aguentar em todos os surtos em disciplinas (e além delas), pelas tardes e noites estudando, por todos os nossos cafés da tarde para relaxar e por sempre estar ao meu lado! E também por todas as caronas, que sempre diminuía o meu trajeto de chegar até em casa. Gostaria também de agradecer a Viviane Brandão, porque além de acreditar e vibrar por todas as minhas conquistas, me apresentou a Fiocruz e me recomendou para essa oportunidade incrível de vida.

Às minhas Carolina Martins, Crystal Cipriano, Letícia Nunes, Gabriel Freire e Virgínia Lima, muito obrigada por estarem ao meu lado durante toda a graduação, pois sem vocês isto definitivamente não seria possível.

Gostaria de agradecer profundamente meu namorado, Luan Rocha. Ele não foi apenas o meu namorado, mas sim o meu suporte, o meu auxílio, minha âncora, meu conforto. Esteve comigo em todos os momentos ruins, ouviu todas as minhas lágrimas e secou todas as minhas

lágrimas. Além disso, me ajudava sempre com apresentações, imagens, me ajudava a estudar, a sempre melhorar, a sempre se reerguer e jamais desistir. Sempre me prestigiava quando podia e comemorava minhas conquistas como se fossem suas. Obrigada por estar do meu lado, apesar de tantos obstáculos que aconteceram neste ano, você definitivamente o fez mil vezes melhor.

Por fim gostaria de agradecer ao chefe do laboratório, Marcelo Pelajo Machado, por ter me recebido no laboratório de braços abertos e às agências do Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Programa Inova Fiocruz, CNPq e FAPERJ que proporcionaram a realização deste projeto.

“Nunca ande por trilhas, pois assim só irá até onde outros já foram”

- Alexandre Graham Bell

## CIP - Catalogação na Publicação

T596c Tiradentes, Mariana Barata Viana  
Caracterização histopatológica da infecção pelo  
vírus da Febre Amarela (PR4408) em Hamster Sírio  
(Mesocricetus auratus) / Mariana Barata Viana  
Tiradentes. -- Rio de Janeiro, 2023.  
104 f.

Orientador: Pedro Paulo de Abreu Manso.  
Coorientador: Fernanda de Oliveira Bottino.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. febre amarela. 2. flavivirus. 3. hamster  
sírio. 4. histopatologia. 5. biomodelos. I. de Abreu  
Manso, Pedro Paulo, orient. II. de Oliveira  
Bottino, Fernanda, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): Mariana Barata Viana Tiradentes                      DRE: 120068045**

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Iranaia Assunção Miranda (Presidente)  
 Dr. Arthur da Costa Rasinhas  
 Msc. Daniela del Rosário Flores Rodrigues  
 Profa. Dra. Maria Teresa Villela Romanos (Suplente)

**Título da Monografia: "CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA (PR4408) EM HAMSTER SÍRIO (*Mesocricetus auratus*)"**

**Local: Anfiteatro do IMPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 06 de dezembro de 2023 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 06 de dezembro de 2023.

**NOTA:**

10,0

10,0

10,0

**Banca Examinadora:**

*Iranaia Assunção Miranda*

Profa. Dra. Iranaia Assunção Miranda (Presidente)

*Arthur da Costa Rasinhas*

Dr. Arthur da Costa Rasinhas

*Daniela del Rosário Flores Rodrigues*

Profa. Dra. Maria Teresa Villela Romanos (Suplente)

*Mariana Tiradentes*

Mariana Barata Viana Tiradentes

**Aluno(a):**

**Orientador(a)**

**(e coorientador):**

**Coordenadora de**

**TCC:**

*Pedro Paulo de Abreu Manso*

Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso e Msc. Fernanda de Oliveira Bottino

*Marihella Silva Laport*

Profa. Marihella Silva Laport



## RESUMO

MARIANA BARATA VIANA TIRADENTES

### CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA (PR4408) EM HAMSTER SÍRIO (*Mesocricetus auratus*)

**Orientador: Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso**  
**Coorientadora: Msc. Fernanda de Oliveira Bottino**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A Febre Amarela (FA), doença infecciosa causada por vírus da Febre Amarela (VFA), acomete principalmente populações da região tropical da América do Sul e África Subsaariana. Apesar de uma vacina eficaz, ainda existem regiões endêmicas, devido a manutenção do ciclo silvestre e da presença de indivíduos não vacinados. Atualmente, o modelo preferencial para o estudo da FA é o macaco Rhesus, contudo, como o uso de primatas não humanos é limitado, outros modelos têm sido estudados, como o Hamster Sírio, que necessita de cepas adaptadas. No Brasil, cepas circulantes nos últimos anos têm demonstrado a tendência de evadir da resposta vacinal, além de possuírem polimorfismos que podem estar associados ao aumento da transmissão e virulência em mamíferos. Dentre elas, destaca-se a cepa PR4408, isolada de um macaco bugio, que em estudos conduzidos por nosso grupo foi capaz de infectar Hamsters sem adaptação. Tendo isso em vista, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histopatológicas em Hamster Sírio causadas pela infecção experimental pela cepa PR4408. Para tal, os animais foram inoculados via intraperitoneal com o VFA ( $10^{4-5}$  PFU/mL) e foram clinicamente avaliados por 14 dias. Os animais foram eutanasiados em diferentes dias pós-infecção (dpi), e tiveram diferentes tecidos coletados e submetidos ao processamento histológico convencional, corados com Hematoxilina-Eosina e observados em microscópio de campo claro. O RNA viral foi detectado por RT-PCR nos fígados em 2, 5, 7, 9 e 14 dpi. Na análise histológica hepática foram observadas em 5 dpi, corpúsculos de Councilman Rocha Lima, apoptose e infiltrado inflamatório peri-portal, com imunomarcagem positiva para linfócito T e B. Em 6 e 7 dpi, as alterações se mantêm, com adição de congestão dos sinusóides e esteatose, contudo, em 7 dpi, elas aparecem de forma mais acentuada, juntamente com necroapoptose de hepatócitos e imunomarcagem de macrófagos e caspase-3 em áreas de lesão. Em 9 dpi, há indícios de regeneração, como mitose, infiltrado periportal menos evidentes e *clearance* de restos celulares com presença de células T, que se mantêm aos 14 dpi. A análise histológica esplênica revelou, em 2 dpi a ocorrência de hiperplasia da zona marginal do folículo linfóide. Em 5, 6, 7 e 9 dpi, apoptose na polpa branca e vermelha, aparecimento de macrófagos ativados, nos quais também foram imunomarcados, neutrofilia e perda da zona marginal foram observados. Ademais, a imunomarcagem de células B e T não demonstrou predominância. Aos 14 dpi, observou-se uma regeneração do tecido, sem as alterações descritas anteriormente e

com a presença da zona marginal dos folículos bem delimitada. No pâncreas, foram observados pontos de apoptose em 5, 6 e 7 dpi. No rim, nenhuma alteração digna de nota foi observada. Estes resultados confirmaram a capacidade de infecção da cepa PR4408 e demonstram que este modelo desenvolve patologia semelhante à humana, sendo uma alternativa interessante para estudos de fisiopatologia da FA.

**Palavras-chave:** flavivirus, febre amarela, hamster sírio, biomodelos, histopatologia

**ABSTRACT****MARIANA BARATA VIANA TIRADENTES****HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF YELLOW FEVER VIRUS (PR4408) INFECTION IN A SYRIAN GOLDEN HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)****Orientador: Pedro Paulo de Abreu Manso  
Coorientador: Fernanda de Oliveira Bottino**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Yellow Fever (YF), an infectious disease caused by YFV, mainly affects populations in the tropical region of South America and sub-Saharan Africa. Despite an effective vaccine, there are still endemic regions, due to the maintenance of the sylvatic cycle and the presence of unvaccinated individuals. Today, the preferred model for studying YF is the Rhesus monkey, however, as the use of non-human primates is limited, other models have been studied, such as the Golden Hamster, which requires adapted strains. In Brazil, strains circulating in recent years have demonstrated a tendency to evade the vaccine response and to having polymorphisms that may be associated with increased transmission and virulence in mammals. Among them, the PR4408 strain stands out, isolated from a howler monkey, which in studies conducted by our group was capable of infecting hamsters without adaptation. Thus, the objective of this study was to evaluate the histopathological disorders in Golden Hamsters caused by experimental infection with the PR4408 strain. For such, the animals were inoculated intraperitoneally with YFV ( $10^{4-5}$  PFU/mL) and were clinically evaluated for 14 days. The animals were euthanized on different days post-infection (dpi), and had different tissues collected and subjected to conventional histological processing, stained with Hematoxylin-Eosin and observed by a bright field microscope. Viral RNA was detected by RT-PCR in livers at 2, 5, 7, 9, and 14 dpi. In the liver histological analysis, Councilman Rocha Lima bodies, apoptosis and peri-portal inflammatory infiltrate were observed at 5 dpi, with positive immunostaining for T and B lymphocytes. At 6 and 7 dpi, the disorders were maintained, with the addition of sinusoid congestion. and steatosis, however, at 7 dpi, they appear more markedly, along with necroapoptosis of hepatocytes and immunostaining of macrophages and caspase-3 in areas of injury. At 9 dpi, there are signs of regeneration, such as mitosis, less evident periportal infiltrate and *clearance* of cellular debris with T cells, which is maintained at 14 dpi. Splenic histological analysis revealed, at 2 dpi, the occurrence of hyperplasia of the marginal zone of the lymphoid follicle. At 5, 6, 7 and 9 dpi, apoptosis in the white and red pulp, appearance of activated macrophages, which were also immunostained, neutrophilia and loss of the marginal zone were observed. Furthermore, immunostaining of B and T cells did not demonstrate a predominance. At 14 dpi, tissue regeneration was observed, without the disorders described previously and with the presence of a well-defined marginal zone of the follicles. In the pancreas, points of

apoptosis were observed at 5, 6 and 7 dpi. In the kidney, no noteworthy disorders were observed. These results confirmed the infection capacity of the PR4408 strain and demonstrate that this model develops pathology similar to that of humans, being an interesting alternative for studies on the pathophysiology of YF.

**Key-words:** flavivirus, yellow fever, syrian golden hamster, biomodels, histopathology

**RESUMO PARA LEIGOS****MARIANA BARATA VIANA TIRADENTES****ANÁLISE DE ORGÃOS DE HAMSTER SÍRIOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA FEBRE AMARELA****Orientador: Pedro Paulo de Abreu Manso  
Coorientadora: Fernanda de Oliveira Bottino****Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A Febre Amarela é uma doença grave causada por um vírus que atinge as populações da América do Sul e África Subsaariana. Além disso, diversos aspectos sobre como ocorre a doença precisam ser esclarecidos, porque a maioria dos estudos são de casos humanos fatais. Para isso, utilizam-se modelos animais e os melhores modelos para estudar a doença são macacos, mas o seu uso é limitado devido ao seu alto custo e questões éticas, sendo o hamster sírio uma alternativa mais barata, mais fácil manutenção e com menos restrições éticas. No Brasil, foi observado a presença de variantes do vírus em que a vacina da febre amarela não é capaz de proteger, com isso, aumentando as chances de ocorrer a doença em cidades muito povoadas. A febre amarela pode causar problemas em diversos órgãos do nosso corpo, principalmente fígado e baço. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações causadas pela doença em diferentes órgãos de hamsters sírios infectados com o vírus da febre amarela. Após infectados eles foram sacrificados em diferentes dias e observados por 14 dias. Em todos os dias analisados, o vírus da febre amarela se mostrou presente nos fígados dos animais, que é o órgão mais afetado. Além disso, o fígado e o baço nos primeiros dias apresentaram um aspecto grave da doença, semelhante ao que ocorre em humanos. Entretanto, ao longo do tempo, eles já apresentaram sinais de recuperação. O pâncreas apresentou aspecto grave somente nos primeiros dias, enquanto que os rins não apresentaram em nenhum momento. Estes resultados mostram que o hamster desenvolve a doença semelhante a que ocorre em humanos e é capaz de se recuperar, sendo uma alternativa interessante para se estudar febre amarela.

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO PARA LEIGOS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. O vírus da Febre Amarela .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Organização da partícula viral .....	1
1.1.2. Replicação viral .....	2
1.1.3. Ciclo biológico da Febre Amarela .....	6
<b>1.2. Epidemiologia da Febre Amarela .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Vacina contra Febre Amarela .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Quadro clínico da Febre Amarela .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela.....</b>	<b>14</b>
<b>1.6. Patogênese e patologia da Febre Amarela .....</b>	<b>17</b>
<b>1.7. Modelos animais de estudo da Febre Amarela .....</b>	<b>28</b>
1.7.1. Primatas não humanos .....	28
1.7.2. Camundongo .....	30
1.7.3. Hamster sírio .....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Objetivos específicos .....</b>	<b>34</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Infecção experimental e análise clínica dos animais .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Cepa de Febre Amarela .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3. Análise da produção de partículas infecciosas por titulação viral .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Extração de RNA dos tecidos pelo Trizol.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5. Detecção do material genético viral por RT-PCR.....</b>	<b>38</b>
<b>4.6. Eletroforese em gel de agarose .....</b>	<b>39</b>
<b>4.7. Processamento Histológico .....</b>	<b>39</b>
<b>4.8. Imunofluorescência Indireta .....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA.....</b>	<b>41</b>

<b>5.2. DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA POR RT-PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....</b>	<b>44</b>
5.3.1. FÍGADO .....	44
5.3.2. BAÇO .....	50
5.3.3. PÂNCREAS.....	55
5.3.4. RIM.....	57
<b>5.4. CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4.1. FÍGADO .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4.2. BAÇO.....</b>	<b>68</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Esquema do genoma viral de um <i>flavivirus</i> .....</b>	<b>1</b>
<b>Figura 2: Esquema do genoma do vírus da Febre Amarela com a poliproteína formada após a tradução e das proteínas virais. ....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3: Biossíntese de partículas virais por <i>flavivirus</i>. ....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4: Ciclos biológicos da Febre Amarela. ....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 5: Áreas de risco de transmissão da Febre Amarela na África. ....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 6: Áreas de risco de transmissão da Febre Amarela na América do Sul. ....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 7: Fases clínicas da forma clássica da Febre Amarela. ....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 8: Distribuição das formas clínicas da Febre Amarela. ....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 9: As seqüências do vírus da Febre Amarela que carregam a assinatura molecular do YFV 2000-2010. ....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 10: Representação esquemática da composição genômica da PR4408. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 11: Análise estatística da replicação viral de cepas circulantes no Brasil na presença de IFN-alfa (A), IFN-beta (B) e citotoxicidade em células Vero (C). ....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 12: Esquema da Patogênese da Febre Amarela. ....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 13: Ácinos hepáticos evidenciando as zonas do lóbulo. ....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 14: Histologia do fígado de um paciente infectado pelo vírus da Febre Amarela. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 15: Histologia de um fígado de um caso fatal de Febre Amarela submetido a transplante hepático. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 16: Histologia do fígado de um paciente infectado com o vírus da Febre Amarela. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 17: Histologia do rim de primata não humano (<i>Saimiri spp.</i>) infectado com o vírus Febre Amarela .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 18: Histologia do baço de macaco Rhesus infectado experimentalmente com o vírus Febre Amarela. ....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 19: Histologia do baço de Hamster sírio infectado com o vírus Febre Amarela. ....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 20: Histologia do baço de caso fatal de Febre Amarela humana. ....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 21: Histologia de pâncreas de Hamster sírio infectado experimentalmente com o vírus Febre Amarela. ....</b>	<b>28</b>



<b>Figura 22: Desenho experimental da infecção dos hamsters sírios pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 23: Gráfico da variação do peso em porcentagem de hamster sírios infectados pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela durante 14 dias após a infecção.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 24: Figura 24: Eletroforese em gel de agarose de amostras de fígados de hamsters sírios infectados experimentalmente pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela em 2, 5, 6, 7, 9 e 14 dias pós-infecção.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 25 (A-D): Secções histológicas de fígado de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 2 dias pós-infecção.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 26 (A-B): Secções histológicas de fígado de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 5 dias pós-infecção.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 27 (A-D): Secções histológicas de fígado de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 6 dias pós-infecção.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 28 (A-D): Secções histológicas de fígado de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 7 dias pós-infecção.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 29 (A-F): Secções histológicas de fígado de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 9 dias pós-infecção.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 30 (A-E): Secções histológicas de fígado de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 14 dias pós-infecção.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 31 (A-B): Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 2 dias pós-infecção.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 32 (A-D): Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 5 dias pós-infecção.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 33 (A-D): Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 6 dias pós-infecção.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 34 (A-D): Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 7 dias pós-infecção.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 35 (A-F): Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 9 dias pós-infecção.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 36 (A-D): Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 14 dias pós-infecção.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 37 (A-D): Secções histológicas de pâncreas de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 sem alterações histopatológicas.....</b>	<b>56</b>

<b>Figura 38 (A-F): Secções histológicas de pâncreas de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 39 (A-H): Secções histológicas de rim de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 sem alterações histopatológicas.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 40 (A-D): Secções histológicas de fígado de hamsters sírio em 7 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela imunomarcados.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 41 (A-F): Secções histológicas de fígado de hamsters sírio em 7 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela imunomarcados.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 42 (A-H): Secções histológicas de fígado de hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela imunomarcados com CD3 (linfócitos T) no espaço porta.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 43 (A-F): Secções histológicas de fígado de hamsters sírios 9 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela imunomarcado.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 44: Secções histológicas de baço de hamster sírio imunomarcados.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 45: Secções histológicas de baço de hamster sírios em 7 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela imunomarcados.....</b>	<b>71</b>

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1: Parâmetros clínicos avaliados para a determinação do <i>endpoint</i> humanitário na ficha de acompanhamento dos animais .....</b>	<b>35</b>
<b>Quadro 2: Mix de desnaturação do RNA .....</b>	<b>38</b>
<b>Quadro 3: Master Mix para transcrição reversa.....</b>	<b>38</b>
<b>Quadro 4: Master Mix para reação em cadeia da polimerase.....</b>	<b>39</b>
<b>Quadro 5: Relação dos anticorpos primários utilizados para imunomarcação.....</b>	<b>40</b>
<b>Quadro 6: Relação dos anticorpos secundários utilizados para imunomarcação.....</b>	<b>41</b>
<b>Quadro 7: Resumos dos parâmetros molecular e histopatológicos da infecção experimental pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela em hamster sírio .....</b>	<b>59</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

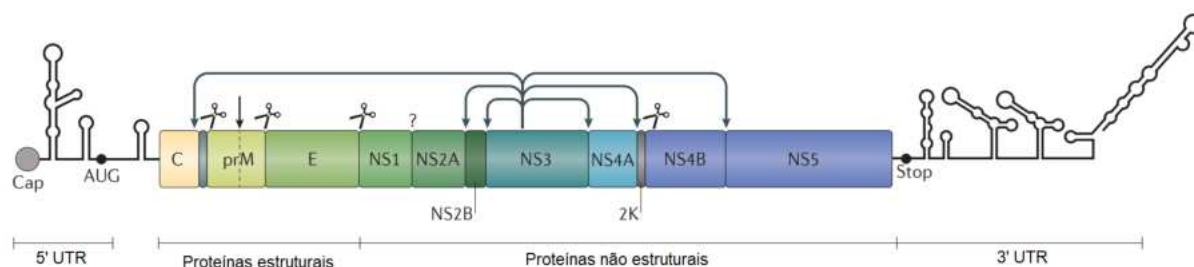
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
dpi	dias após a infecção
IFN	interferon
MOI	multiplicidade de infecção
NS	não-estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PNHs	primatas não humanos
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. O vírus da Febre Amarela

### 1.1.1. Organização da partícula viral

O agente causador da febre amarela é um vírus envelopado do gênero *Orthoflavivirus* (Postler *et al.*, 2023) e família *Flaviviridae* de material genético de RNA fita simples, não segmentado e polaridade positiva (Barret; Higgs, 2007; Beck *et al.*, 2013). A partícula viral é icosaédrica e possui em torno de 50 nanômetros (nm) (Barrett; Higgs, 2007). O seu genoma possui 10.8 kilobases, com as extremidades 5' e 3', o qual possui uma única fase de leitura que é codificante para três proteínas virais estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E); e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 1). As proteínas estruturais formam a partícula viral e as proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação do vírus e evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossman, 2005; Barrett *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2009).



**Figura 1: Esquema do genoma viral de um flavivirus.** Genes C, M e E codificam proteínas estruturais. Genes NS codificam proteínas não estruturais. O genoma geral de flavivirus contém uma estrutura cap na extremidade 5'. A tesoura indica a clivagem da poliproteína por peptidases celulares. As setas cinzas indicam clivagem por proteases virais e as setas verticais indicam clivagem por furinas do complexo de Golgi. As interrogações indicam clivagem por proteases desconhecidas. Adaptado de Neufeldt *et al.*, 2018

O vírus é formado pelas proteínas C do capsídeo, prM e proteína E constituinte do envelope. As proteínas não estruturais já possuem diversas funções. A NS1 em sua forma hexamérica secretada (extracelular) possui função de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, na patogênese e na interação com os mosquitos vetores. Por outro lado, a NS1, dimerica e intracelular residente do lúmen do retículo endoplasmático, e NS2A, proteína transmembranar hidrofóbica, interagem com as demais NSs, dessa forma, desempenham um papel na replicação viral e na produção de partículas infecciosas (Zhang *et al.*, 2023). Mais

especificamente, a NS1 atua na síntese da fita negativa e a NS2A atua na síntese de membranas durante a montagem viral (Leung *et al.*, 2008). NS2B é um cofator que recruta NS3 para a membrana do retículo endoplasmático, esta que possui multifuncionalidade: protease, NTPase, RNA 5' trifosfatase e helicase (Neufeldt *et al.*, 2018). NS4A se localiza integralmente na membrana e possui a capacidade de induzir rearranjos na membrana com intuito de formar o complexo replicativo (Miller *et al.*, 2007; Roosendaal *et al.*, 2006). O peptídeo 2K atua como um sinalizador para a inserção co-traducional de NS4B na membrana do retículo endoplasmático, NS4B que interage com NS3, assim, regula a replicação viral (Umareddy *et al.*, 2006). Além disso, NS4B também possui a função de inibir a resposta anti-viral interferon tipo I nas células hospedeiras (Munoz-Jordan *et al.*, 2005). A proteína NS5 é a proteína mais conservada entre os flavivirus, que contém uma metiltransferase N-terminal que vai atuar na metilação do RNA viral, dessa maneira, a fim de evadir a resposta imunológica do hospedeiro evitando o seu reconhecimento (Zhao *et al.*, 2015; Daffis *et al.*, 2010). A NS5 também possui a função de RNA polimerase dependente de RNA que possui a função de realizar a replicação do RNA viral. Ademais, a proteína NS5 de flavivírus interfere na via de JAK-STAT dependente de IFN-I (Lubick., *et al* 2015). Em relação ao vírus da febre amarela, a NS5 faz a supressão da tradução de genes estimulados por interferon (Laurent-Rolle *et al.*, 2014).

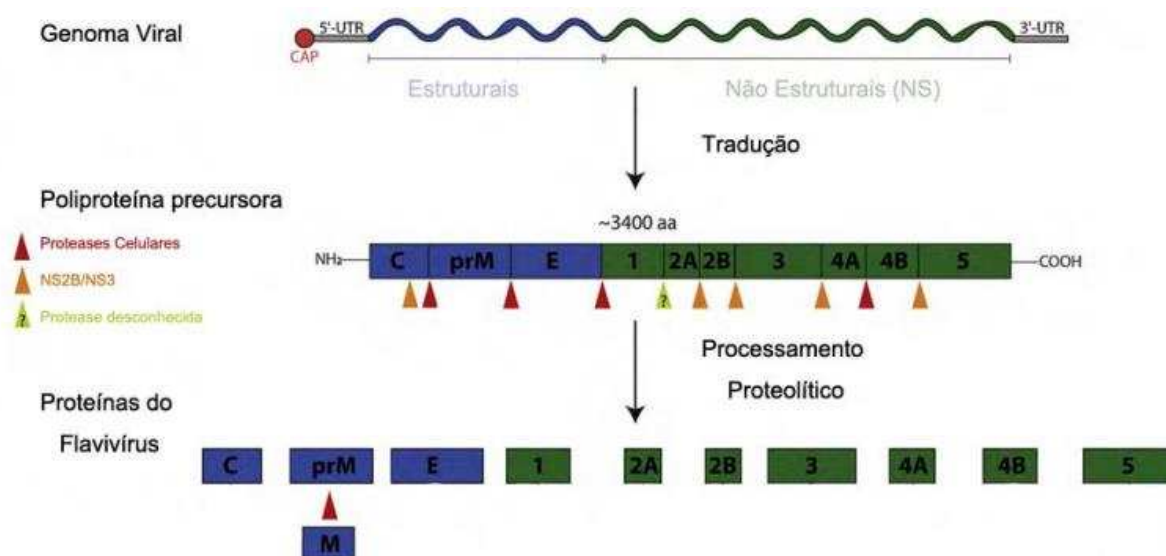
### **1.1.2. Replicação viral**

Ao entrar em contato com a célula hospedeira, o vírus utiliza a glicoproteína E, que faz parte do envelope viral. Essa proteína vai interagir com a membrana da célula, mais especificamente glicosaminoglicanos e proteoglicanos (Perera-Lecoin *et al.*, 2014). Os principais receptores celulares que participam desse processo são os receptores das famílias TIM e TAM, que são frequentemente envolvidos em células com capacidade de eferocitose (Perera-Lecoin *et al.*, 2014).

Em humanos, os receptores da família TIM são TIM-1, TIM-3 e TIM-4. O receptor TIM-1 é expresso por linfócitos Th2 e células epiteliais (Kondratowicz *et al.*, 2011); TIM-3 é expresso por linfócitos Th1 (Monney *et al.*, 2002); e TIM-4 é expresso por células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas (Kobayashi *et al.*, 2007), que são os primeiros alvos dos flavivírus. Já a família de receptores TAM se apresenta em TYRO3, AXL e MER (Lai; Lemke, 1991). O receptor TYRO3 é encontrado no sistema nervoso central, enquanto que MER e AXL podem ser encontrados em células apresentadoras de antígeno, como monócitos e macrófagos (Rothlin; Lemke, 2010). Os receptores TIM e TAM

possuem a função atrelada à fagocitose de células apoptóticas, processo denominado eferocitose, e regulação da imunidade inata e adaptativa (Freeman *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2003; Rothlin *et al.*, 2007). A expressão ectópica de TIM-1, TIM-4, TYRO3 e AXL aumenta com a infecção de flavivírus, como dengue e febre amarela (Kuadkitkan *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que TIM-1 é importante para a permissividade por flavivírus, visto que o seu silenciamento inibe a entrada do vírus e que a expressão endógena de AXL é importante na infecção de astrócitos (Kuadkitkan *et al.*, 2010).

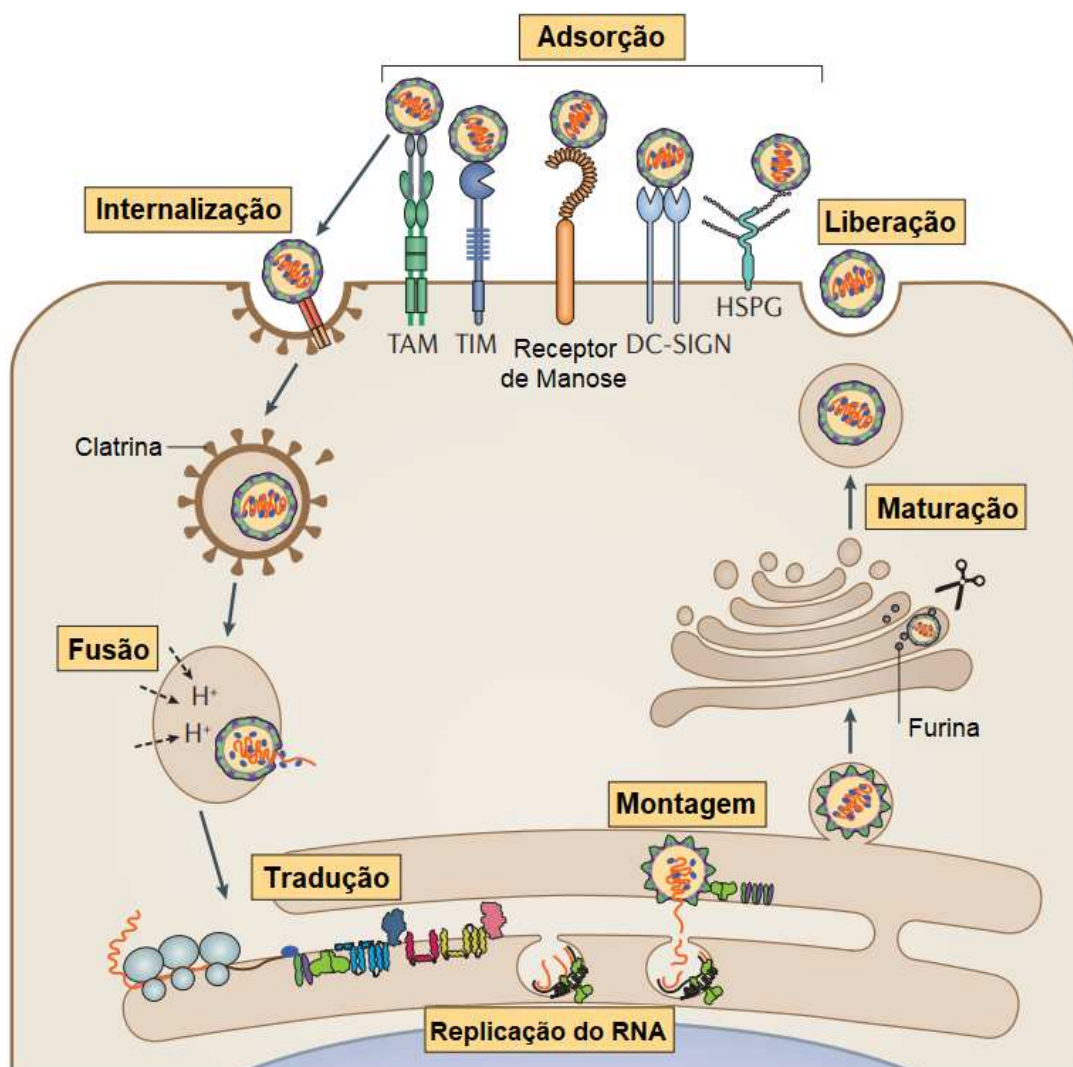
Após a ligação do vírus aos receptores, ele é endocitado e permanece dentro de uma vesícula revestida por clatrina, que vai se ligar no endossoma primário presente no citoplasma celular (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005; Smit *et al.*, 2011). A acidez no interior do endossoma provoca uma mudança na conformação da proteína E, na qual sofre o processo de trimerização. A mudança conformacional permite a exposição do peptídeo de fusão que vai culminar com a fusão do envelope com a membrana do endossomo (Smit *et al.*, 2011; Kaufmann; Rossmann, 2011). A partir desta etapa, ocorre a liberação do nucleocapsídeo. No citoplasma, o capsídeo é dissociado e o RNA viral é liberado para ser replicado (Figura 3) (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005). Como produto da tradução, ocorre a geração de uma poliproteína precursora que é processada pela maquinaria celular e por proteínas do vírus, formando as proteínas estruturais (E, M e C) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 2) (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).



**Figura 2: Esquema do genoma do vírus da febre amarela com a poliproteína formada após a tradução e das proteínas virais.** O genoma de flavivirus possui um único quadro de leitura aberta que tem em torno de 10 kb que codifica as proteínas estruturais (em azul) e proteínas não-estruturais (em verde), o 5'-CAP e regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3'. Após a tradução, ocorre a formação de uma poliproteína precursora imatura que é clivada por proteases celulares (seta vermelha), proteases virais (setas laranja) e protease desconhecida (seta amarela), formando três proteínas estruturais (em azul) e sete proteínas não estruturais (em verde). Adaptado de Pastorino *et al.*, 2010.

A replicação ocorre no citoplasma e no retículo endoplasmático rugoso da célula. Inicialmente, ocorre a transcrição do RNA de polaridade negativa, que é o intermediário replicativo, visto que o RNA do genoma do vírus é de polaridade positiva. Esta etapa é feita pelo complexo de replicação composto de proteínas não estruturais (Lindenbach *et al.*, 2007; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009). A molécula de RNA de polaridade negativa será usada como molde para síntese de novas moléculas de polaridade positiva, que formarão o nucleocapsídeo (Lindenbach *et al.*, 2007; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009). As partículas imaturas, que são inicialmente formadas no lúmen do retículo, passam a ser infecciosas ao entrarem em contato com o complexo de Golgi, no qual vai ocorrer a clivagem de prM em M com atuação de furinas, ocorrendo a liberação de peptídeo pr. A partícula infecciosa (madura) vai para o meio extracelular por exocitose nas vesículas de Golgi (Figura 3) (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).



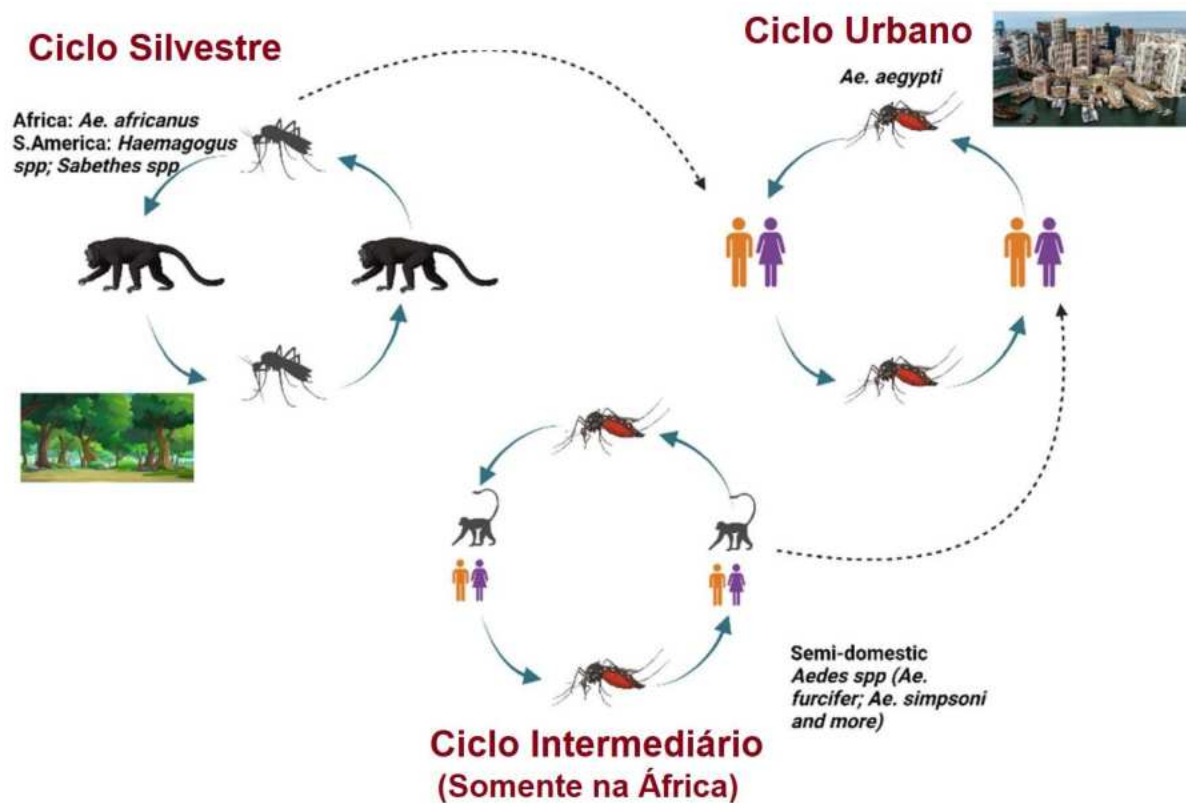


**Figura 3: Biossíntese de partículas virais por flavivirus.** Os flavivírus ao entrar em contato com a superfície de células suscetíveis, em primeiro momento, interagem com fatores de ligação, em seguida, interagem com receptores de ligações específicas que vão atuar na internalização endocítica do vírus. O receptor DC-SIGN é presente em células dendríticas, o receptor de manose é presente em macrófagos, e os membros da família de fosfatidilserina TIM, fazem parte do domínio de mucina de imunoglobulina de células T, e TAM, são receptores de proteína quinase de tirosina 3. Após ligação específica, as partículas virais entram por uma via dependente de clatrina. Ocorre a entrada de íons  $H^+$  dentro da vesícula que culmina na acidificação do ambiente endossomal que permite a fusão da membrana do vírus com a do endossoma. Dessa forma, o RNA viral de polaridade positiva é liberado para o citoplasma da célula que será reconhecido pelo ribossomo que realiza a tradução, colimando na produção de uma poliproteína precursora. Após o processamento por proteases virais e celulares, inicia-se a replicação viral na membrana do retículo endoplasmático com a síntese de um intermediário replicativo de polaridade negativa, que serve de molde para a produção do genoma. O RNA viral de polaridade positiva é encapsidado e brota do lúmen do retículo endoplasmático, seguindo para o complexo de Golgi. Em seguida, as partículas sofrem maturação pela clivagem do peptídeo prM em M por ação de furinas. Ao final, as partículas são liberadas dentro de vesículas por exocitose. Adaptado de Neufeldt *et al.*, 2018.

### 1.1.3. Ciclo biológico da Febre Amarela

O vírus da febre amarela é transmitido por mosquitos vetores do gênero *Aedes*, *Sabethes* e *Haemagogus sp* (Kaul *et al.*, 2018; Javelle; Gautret; Raoult, 2019). O vírus da febre amarela circula no ambiente urbano, silvestre (enzoótico) e intermediário (Figura 4) (CDC, 2023). O ciclo silvestre ocorre em florestas e se mantém entre mosquitos vetores, como *Aedes spp.*, *Haemagogus spp.* e *Sabethes spp.*, e primatas não humanos (PNHs). Um indivíduo, como um viajante não vacinado, pode ser infectado nas florestas e retornar às cidades no período de viremia, iniciando o ciclo urbano. Nas cidades, o vírus da febre amarela circula entre o mosquito vetor, o *Aedes aegypti*, e humanos (Vasconcelos, 2003). O ciclo intermediário, que apenas existe em áreas rurais da África que fazem fronteira com savanas ou florestas, se mantém entre mosquitos, PNHs e humanos. Neste ciclo, os vetores do gênero *Aedes spp.* (*Ae. furcifer*, *Ae. bromeliae*, *Ae. luteocephalus*) semi-doméstico teriam a função de transmitir para a população residente próxima as florestas (Germain, 1982; CDC, 2023).

A erradicação da febre amarela não é possível, pois a mesma é mantida pelo ciclo silvestre, natural, no qual o vetor transmite o vírus para os seus descendentes (via transovariana) (Chambers *et al.*, 1990) e por PNHs que vivem naturalmente nesse ambiente servindo como reservatório e amplificadores da infecção (Rodhain, 1991). Os PNHs da América são menos resistentes à infecção do que os oriundos da África. Dessa forma, um primata americano, ao ser infectado, geralmente, adoece e morre, sendo um indicativo da circulação do vírus pelo continente. Os sobreviventes se tornam imunes à febre amarela (Rodhain, 1991). Por outro lado, a infecção geralmente ocorre assintomática ou branda nos PNH africanos, por serem mais resistentes e, desta forma, torna-se mais difícil a detecção da circulação do vírus pelo continente africano (Rodhain, 1991).



**Figura 4: Ciclos biológicos da Febre Amarela.** Esquema representativo dos ciclos silvestre, urbano e intermediário. O ciclo silvestre ocorre em florestas e é mantido entre mosquitos silvestres do gênero *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* e hospedeiros PNHs. Já o ciclo urbano ocorre nas cidades e entre a espécie de mosquito *Aedes aegypti* e hospedeiros humanos. Por outro lado, o ciclo intermediário ocorre apenas em áreas de savana na África e é mantido por mosquitos semi-domésticos do gênero *Aedes* que transmitem para hospedeiros humanos e PNHs. Adaptado de Shinde *et al.*, 2022.

## 1.2. Epidemiologia da Febre Amarela

A febre amarela acomete principalmente as populações da África Subsaariana e tropical da América do Sul (Figura 5 e Figura 6). A maior parte dos casos que ocorrem anualmente são decorrentes do ciclo silvestre ou intermediário, entretanto ciclos urbanos podem ocorrer periodicamente na África (CDC, 2018).



**Figura 5: Áreas de risco de transmissão da Febre Amarela na África.** Em amarelo, estão destacadas as regiões nas quais a vacina contra a febre amarela é recomendada. Em verde, estão destacadas as regiões nas quais a vacina contra a febre amarela geralmente não é recomendada. Em cinza, estão destacadas as regiões nas quais a vacina contra a febre amarela não é recomendada. Retirado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2018



**Figura 6: Áreas de risco de transmissão da Febre Amarela na América do Sul.** Em amarelo, estão destacadas as regiões nas quais a vacina contra a Febre Amarela é recomendada. Em laranja, estão destacadas as regiões nas quais a vacina contra a febre amarela passou a ser recomendada desde o surto de 2017. Em verde, estão destacadas das regiões nas quais a vacina contra a febre amarela geralmente não é recomendada. Em cinza, estão destacadas as regiões das quais a vacina contra a febre amarela não é recomendada. Retirado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2018

No período de 1985 a 2012, nas Américas, 95% dos casos da doença foram notificados por Peru (54%), Bolívia (18%), Brasil (16%) e Colômbia (7%) (OPAS, 2015). De 2000 a 2013, foram confirmados laboratorialmente 1.100 casos notificados das Américas, com Brasil e Peru líderes dos maiores números (OPAS, 2015).

Mais especificamente no Brasil, em 2016, ocorreu um surto de febre amarela que foi registrado como o mais grave das últimas décadas. Entre julho de 2016 e abril de 2017 foram

confirmados 691 casos e 220 óbitos e entre julho de 2017 e abril de 2018 foram confirmados 1127 casos e 328 óbitos (Almeida, 2020). Esse surto se propagou para o leste do território brasileiro, no qual a cobertura vacinal é menor, atingindo a população local. Os casos notificados foram classificados como febre amarela silvestre, que abrange os limites entre áreas urbanas e silvestres ou rurais, e em áreas matas e rios (BioFiocruz, 2017). Além disso, os casos de epizootias em PNHs frequentemente são confirmados em estados brasileiros que foram considerados livres do vírus por quase 70 anos (Ministério da Saúde, 2022).

Em 2018, a estimativa global era de 200.000 casos de febre amarela por ano, com 30.000 mortes, com 90% dos casos ocorrendo na África, o que se deve a alta densidade de vetores próximos a um grande número de pessoas não vacinadas (CDC 2018). Dos indivíduos que desenvolvem a doença grave, 20% a 50% morrem (CDC, 2018).

Entre julho de 2019 e junho de 2020, foram notificados 19 casos confirmados no Acre, Pará e Santa Catarina. De julho de 2020 a junho de 2021, foram notificados 9 casos confirmados no Pará e Santa Catarina. Já entre julho de 2021 e junho de 2022, foram confirmados 5 casos de febre amarela com 4 óbitos, no Pará e Tocantins. Todos os casos eram de indivíduos do sexo masculino, entre 20 e 29 anos. Quatro dos casos não eram vacinados e um tinha recebido a vacina em 2018. Os cinco indivíduos foram expostos a áreas silvestres e/ou florestais. Entre julho de 2021 e março de 2022 foram notificadas e registradas 1267 epizootias em PNHs suspeitos de febre amarela, das quais 26 (2,1%) foram confirmadas no Pará (1), Minas Gerais (20), Santa Catarina (3) e Rio Grande do Sul (2) (OPAS, 2022).

Entre 1 de janeiro de 2021 a 7 de dezembro de 2022, foram notificados à OMS 203 casos confirmados e 252 casos suspeitos com 40 mortes (letalidade de 9%) na África. Isso se explica pela maior propagação e amplificação da febre amarela decorrente de uma população de baixa imunidade, dinâmica de transmissão viral e fatores ambientais que contribuem para a disseminação do vetor *Aedes* (WHO, 2023).

Em 2022, foram notificados casos confirmados de febre amarela na Bolívia (cinco casos), Brasil (cinco casos) e Peru (três casos) (OPAS 2022).

A febre amarela é uma doença sazonal, possui época do ano de maior transmissão. Na África, esse período corresponde entre julho e outubro, enquanto que no Brasil, corresponde entre janeiro e março (Monath, 2002). Isto se explica devido a maiores temperaturas e período de chuvas nesses meses, acarretando uma maior proliferação do mosquito vetor e diminuição do período de incubação extrínseca do vírus (Reiter, 2001; WHO, 2013).

Periodicamente, ocorrem surtos isolados ou epidemias de impacto na saúde pública (Pastorino *et al.*, 2010). Isto acontece devido a população residente em áreas de risco e viajantes

não vacinados. Em torno de 400 milhões de pessoas precisam de vacinação para atingir a cobertura populacional de 80%, recomendada pela OMS (Kaul *et al.*, 2018). A vacina contra a febre amarela foi introduzida nos programas de imunização infantil de rotina em 36 dos 40 países que estão classificados como áreas de risco da África e da América do Sul. Entretanto nestes países, a cobertura vacinal é estimada em 47,1%, um valor muito baixo para o controle da doença. A pandemia do COVID-19 contribuiu para que as atividades de vacinação que eram rotineiras se tornassem um desafio, visto que no período de 2020 e 2021, a cobertura da vacina reduziu em 6 dos 13 países com áreas endêmicas. O impacto da pandemia do COVID-19 dificultou as atividades de vacinação como um todo (OPAS, 2023). A escassez vacinal e alta circulação do vírus apontam o crescente risco de (re)introdução em centros urbanos altamente povoados (Shearer *et al.*, 2018).

### 1.3. Vacina contra Febre Amarela

Em 1927, o vírus da febre amarela foi isolado pela primeira vez através do sangue do paciente de 28 anos, chamado Asibi (Frierson, 2010). A partir do isolamento, a amostra Asibi foi inoculada em macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), modelo animal suscetível à infecção (Stokes; Bauer; Hudson, 1928). Em seguida, Max Theiler iniciou um estudo, no qual foram realizadas passagens do vírus em PNH, na qual todas resultaram na morte do animal. Em 1928, foram realizadas 75 passagens com inoculação intracerebral em camundongos. Neste trabalho, diferentemente do ocorrido com macacos, os camundongos chegaram a óbito em tempos cada vez mais curtos após a inoculação intracerebral (Theiler, 1930). Em 1932, novos estudos foram iniciados com as passagens do vírus, entretanto, desta vez *in vitro* utilizando culturas de embriões de galinha (Haagen; Theiler, 1932).

A amostra vacinal 17D foi obtida após 18 passagens em culturas de tecidos embrionários de camundongos (Lloyd; Theiler; Ricci, 1936), 58 passagens em cultura de tecido de embriões de galinha e 144 em cultura de tecido de embrião de galinha desnervado (Frierson, 2010). Desta cepa vacinal 17D, foram feitas 195 passagens em cultura de tecido embrionário de galinha desnervado e em ovos embrionados de galinha obtendo-se a cepa vacinal 17DD (Monath, 2005). A cepa vacinal 17DD é a utilizada no Brasil, na passagem 285 (Monath, 2005).

Apesar da existência de uma vacina segura e eficiente contra a febre amarela, existem relatos de doença neurotrópica (proliferação do vírus no sistema nervoso) e viscerotrópica (infecção pansistêmica similar à forma grave da doença) ligado à vacina (Barrett; Teuwen, 2009; Pulendran, 2009; Rowland; Plackett; Smith, 2012).

Entre o segundo e trigésimo dia após a vacinação, pode ocorrer o desenvolvimento de síndromes relacionadas à doença neurotrópica, como encefalite, doença autoimune do sistema nervoso central ou periférico, e síndrome de Guillain-Barré, com sinais e sintomas como febre alta, cefaleia, encefalite e disfunções neurológicas focais (Barrett; Teuwen, 2009; Pulendran, 2009). Casos de doença neurotrópica decorrente da vacinação acomete em principalmente indivíduos com extremos de idade (menores de 6 meses e acima de 60 anos) e imunossuprimidos (Kitchener, 2004; CDC, 2020).

Entre o segundo e o quinto dia após a vacinação, pode ocorrer o desenvolvimento da doença viscerotrópica ligada à vacina, que é similar à doença grave, caracterizada pela falência múltipla dos órgãos. Os indivíduos podem apresentar sinais e sintomas como febre alta, icterícia, oligúria, artromialgia, bilirrubina elevada, linfopenia, trombocitopenia, instabilidade cardiovascular, até hemorragias, insuficiência respiratória e falência hepática e renal (Pulendran, 2009; Rowland; Plackett; Smith, 2012). A doença viscerotrópica e neurotrópica decorrente da vacinação são eventos adversos graves que são raros, acometendo 1 em 250.000 indivíduos. Entretanto, a taxa de mortalidade da doença neurotrópica é menor que 5%, enquanto que a doença viscerotrópica ligada à vacina pode chegar a 60% de mortalidade (Vasconcelos *et al.*, 2001; Pulendran, 2009; Barrett; Teuwen, 2009).

#### **1.4. Quadro clínico da Febre Amarela**

A doença amarílica pode causar vários quadros: subclínico, leve, moderado e grave. Dessa forma, o indivíduo pode ser assintomático, apresentar sintomas gripais leves e até hemorragia e ir a óbito (Monath; Barrett, 2003). O quadro grave é caracterizado por uma doença sistêmica com viremia alta, lesões principalmente no fígado, no rim e no miocárdio, podendo levar à falência hepato-renal, hemorragia e choque (Pastorino *et al.*, 2010; Simon; Hashmi; Torp, 2017). Este quadro apresenta uma taxa de mortalidade de 20 a 50% (Monath; Barrett, 2003). No hospedeiro humano, o período de incubação é de 3 a 6 dias e três estágios clínicos da febre amarela clássica são descritos: período de infecção, remissão e intoxicação (CDC, 2020). O período de infecção acontece após o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito infectada e o período de incubação do vírus, com duração em torno de 3-5 dias. Este período é caracterizado pela alta viremia com sinais e sintomas inespecíficos que caracterizam a forma leve ou moderada (Vasconcelos, 2003), como mal-estar, cefaleia, náuseas, vômitos, febre alta, dor nas costas e dor muscular (Gardner; Ryman, 2010; Quaresma *et al.*, 2013). Em seguida,



inicia-se o período de remissão (2-12 horas), o qual os sintomas desaparecem e o indivíduo se recupera da doença (Gardner; Ryman, 2010). Entretanto, para alguns indivíduos, este cenário pode ser uma “falsa-cura” e o paciente volta a piorar progressivamente, caracterizando o período de intoxicação, o qual ocorre um quadro viscerotrópico grave com falência hepato-renal, icterícia, instabilidade cardiovascular e hemorragia (Monath; Barrett, 2003). Caso ainda persista, a doença evoluiu para um quadro maligno com disfunção de múltiplos órgãos, febre hemorrágica e todos os sintomas clássicos (icterícia, vomito negro e instabilidade cardíaca) (Figura 7) (Quaresma *et al.*, 2013).



**Figura 7: Fases clínicas da forma clássica da Febre Amarela.** O período de infecção, que ocorre logo após a picada da fêmea dos mosquitos vetores infectados com o vírus da febre amarela, se caracteriza por sinais e sintomas inespecíficos, como febre, dor de cabeça, mialgia, náusea e vômito. Em seguida, inicia-se o período de remissão que ocorre em torno de 24h, sendo caracterizado pela mitigação dos sintomas. A maioria dos pacientes se recuperam. Entretanto, alguns indivíduos entram no período de intoxicação, caracterizado por febre, icterícia, falência renal e hemorragia. Parte destes indivíduos se recuperam, mas a maioria dos indivíduos que apresentam o quadro de intoxicação evoluem para o óbito. Adaptado de Gardner & Ryman, 2010.

Apesar de 90% dos casos de febre amarela serem leves, e outros 10% graves, estes apresentam alta taxa de letalidade de até 50% (Figura 8) (Vasconcelos, 2003).



**Figura 8: Distribuição das formas clínicas da Febre Amarela.** A maioria dos indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela apresentam a infecção assintomática. Em torno de 20-30%, apresentam a forma leve e moderada; 10-20% apresentam a forma grave; 5-10% apresentam a forma maligna. Dos indivíduos que apresentam a forma maligna, 50% evoluem ao óbito. Retirado de Vasconcelos, 2003.

### 1.5. Cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela

O genótipo mais frequente no Brasil é o sul-americano I (Monath e Vasconcelos 2015). Dentro do genótipo I da América do Sul, existem 5 linhagens de 1A a 1E que já foram associadas a epidemias. Desde 2008, apenas a linhagem 1E foi detectada no Brasil (de Souza *et al.*, 2010). Os surtos de febre amarela no Brasil em decorrência da disseminação do vírus estão associados a uma cepa moderna que pertence ao genótipo 1E da América do Sul (Figura 9) (de Souza *et al.*, 2010).

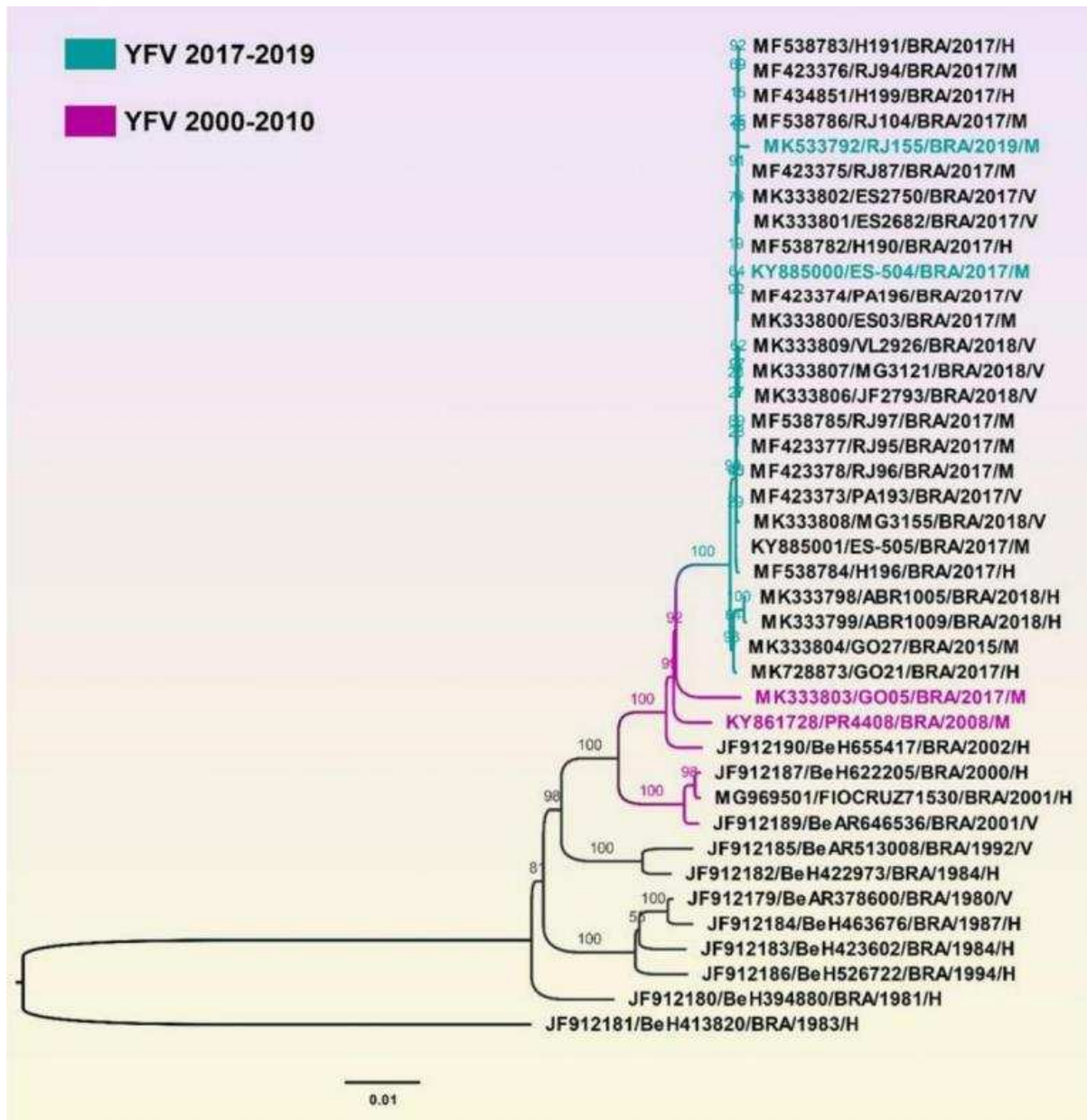
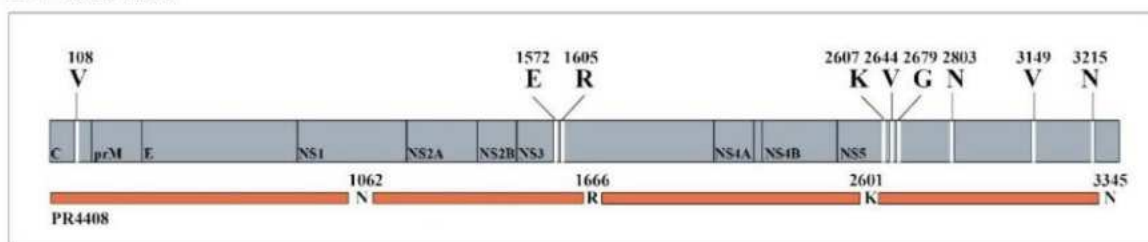


Figura 9: As seqüências do vírus da Febre Amarela que carregam a assinatura molecular do YFV 2000-2010. Genótipos que pertencem a linhagem 1E moderna sinalizados em roxo. Retirado de Furtado *et al.*, 2022.

A cepa utilizada neste estudo foi a PR4408, pertencente a linhagem 1E, relacionada a um grande surto que ocorreu em 2008, no Rio Grande do Sul (RS, Brasil), na fronteira com Uruguai e Argentina (Delatorre *et al.*, 2019). A PR4408 foi isolada de um macaco bugio do gênero *Alouatta spp.* (Delatorre *et al.*, 2019) e possui quatro modificações de aminoácidos nas proteínas NS (NS1 284; NS3 182; NS5 95 e 839) (Furtado *et al.*, 2022).

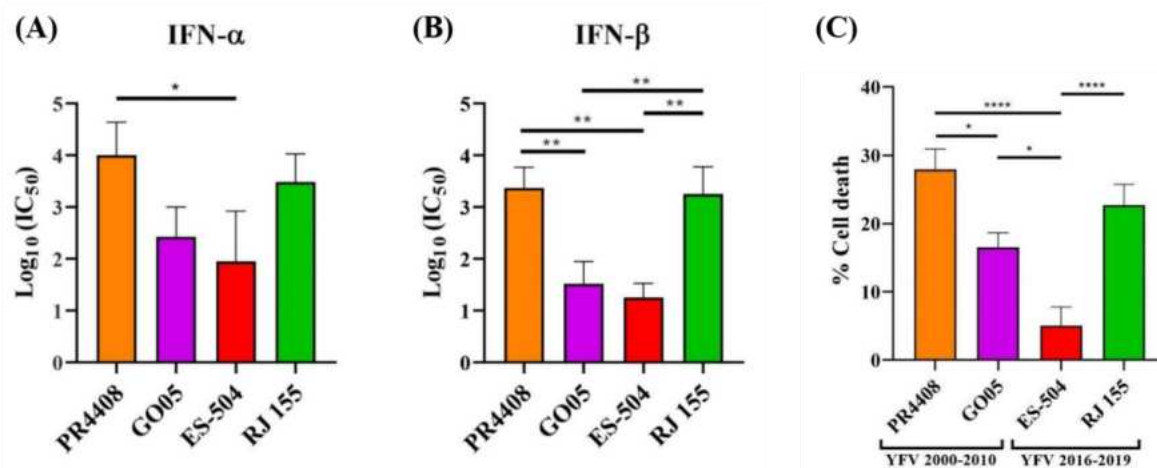
## YFV 2000-2010



**Figura 10: Representação esquemática da composição genômica da PR4408.** A poliproteína precursora viral é representada pelos retângulos, e assinatura molecular que a diferencia os grupos é descrita. As mudanças de aminoácidos de cada isolado são representadas nos respectivos retângulos. Adaptado de Furtado *et al.*, 2022.

Esta cepa apresenta alterações de aminoácidos em NS3 e NS5 que são proteínas atuantes no ciclo replicativo viral, além de interagirem com várias proteínas do hospedeiro, com funções biológicas de tráfego celular, ligação a RNA e modulação de transcrição (Le Breton *et al.*, 2011). Como poliformismos de aminoácidos nas proteínas NS são importantes alvos de seleção positiva em flavivírus (Sironi *et al.*, 2016), estudos recentes buscaram estabelecer o papel funcional das variações em NS3 e NS5 desta cepa, que foi responsável por epizootias e casos humanos da doença no Brasil, ressaltando a importância da vigilância genômica e a caracterização molecular (Brasil, 2019). Mutações genéticas em vírus podem acarretar em mudanças em seus aspectos do ciclo biológico, como em uma competência vetorial do artrópode, fitness viral no hospedeiro mamífero, que possivelmente é uma das causas para surtos sem precedentes e sua disseminação por locais ainda não alcançados (Tsetsarkin *et al.*, 2007; Malikovic *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021).

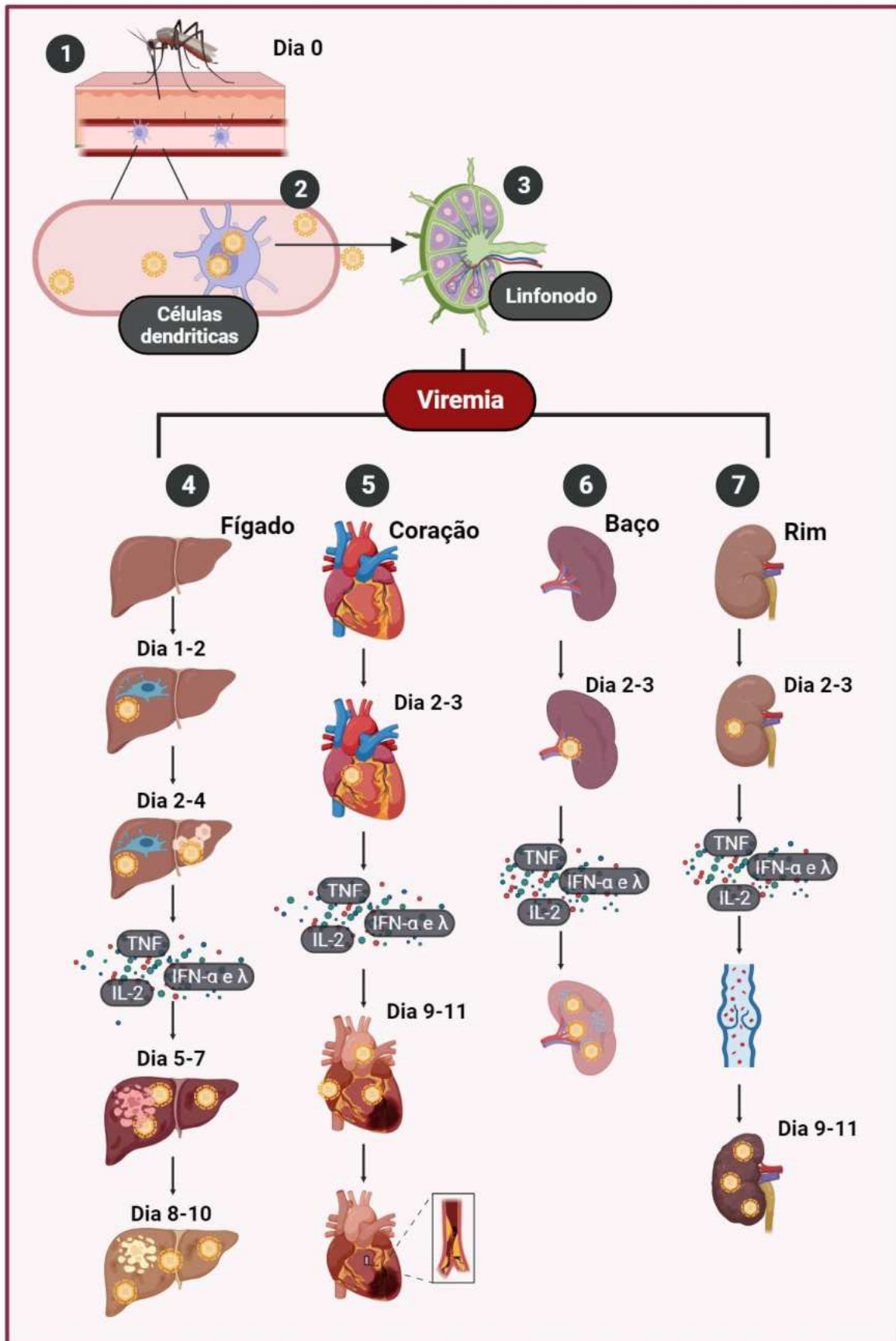
Das cepas de febre amarela analisadas no estudo, o isolado PR4408 apresentou maior infectividade em células de mamífero, como células VERO (linhagem epitelial renal de macaco verde) e células HepG2 (linhagem de câncer hepático), além de maiores taxas de morte celular. Em contrapartida, esta cepa apresentou menores taxas de replicação em células de mosquito, como Aag2. Além disso, ao serem tratadas com interferon (IFN) tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), este isolado apresentou títulos virais elevados (Figura 11) e maior virulência em camundongos BALB/c. Estes resultados sugerem que a PR4408 possui uma capacidade maior de se replicar em células de mamíferos e possivelmente modulam efetivamente a resposta antiviral celular contra IFN tipo I, o que a torna mais virulenta (Furtado *et al.*, 2022).



**Figura 11: Análise estatística da replicação viral de cepas circulantes no Brasil na presença de IFN- $\alpha$  (A), IFN- $\beta$  (B) e citotoxicidade em células Vero (C).** (A) Análise estatística da replicação viral na presença de IFN- $\alpha$ . (B) Análise estatística da replicação viral na presença de IFN- $\beta$  (C) Citotoxicidade induzida por vírus 24h pós-infecção em células Vero em multiplicidade de infecção (MOI) 0,1. A cepa PR4408 do vírus da febre amarela apresentou menor sensibilidade ao IFN tipo-I e induziu maior citotoxicidade em células VERO. Retirado de Furtado *et al.*, 2022.

## 1.6. Patogênese e patologia da Febre Amarela

Existem duas formas de desenvolvimento da febre amarela: a neurotrópica e a viscerotrópica (Quaresma *et al.*, 2013). A primeira está majoritariamente relacionada a um efeito colateral da vacina pelo vírus atenuado. Apesar de raro, pode levar a quadros de encefalite, febre, cefaleia e disfunção neurológica. Esta forma atinge principalmente crianças menores de seis meses, idosos acima de 60 anos e pessoas imunocomprometidas (Kitchener, 2004; CDC, 2020). Entretanto, a forma visceral é a clássica decorrente do repasto sanguíneo da fêmea do mosquito vetor infectada que transmite para o hospedeiro por meio da sua saliva contendo vírus. Após a sua entrada, os vírus entram em contato e infectam as células dendríticas da epiderme (local da picada), a partir disso, estas células apresentadoras de antígeno migram para os linfonodos regionais para realização da função antigênica. Após o contato, começa a replicação viral nos linfonodos que se localizam perto da área de repasto sanguíneo. Com isso, os vírus ganham a corrente sanguínea caracterizando a viremia primária. Devido ao acesso à corrente sanguínea, o flavivirus infecta os rins, baço, coração, pulmão e o fígado, sendo este último o órgão mais afetado (Figura 12) (Vieira *et al.*, 1983; Monath, 2001).

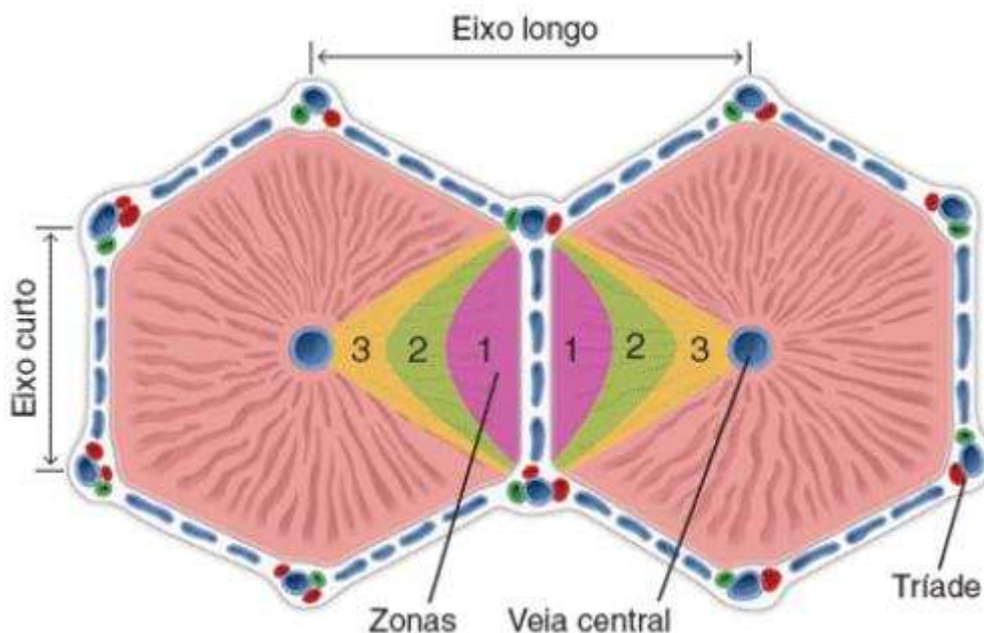


**Figura 12: Esquema da Patogênese da Febre Amarela.** (1) No dia 0, a fêmea do mosquito vetor do gênero *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* infectado com o vírus da febre amarela, que através da sua saliva, transmite o

vírus para o indivíduo. (2) Após a sua entrada, os vírus infectam as células dendríticas da epiderme e (3) migram até o linfonodo mais próximo. Nos linfonodos, o vírus inicia a replicação viral em área próxima de repasto sanguíneo e conseguem acesso a corrente sanguínea, atingindo o fígado entre 1-2 dia pós infecção e coração, baço e rins entre 2-3 dias pós-infecção.(4) Ao chegarem no fígado, as primeiras células a serem acometidas pelo vírus da febre amarela são as células de Kupffer, os macrófagos residentes. Do 2-4 dia pós-infecção, inicia-se a infecção dos hepatócitos. A partir do dia 5-7, são observados apoptose dos hepatócitos e necrose em zona intermediária que se estendem até o 8-10 dia, causando quadro de icterícia no indivíduo. (5) O coração também é um dos órgãos cometidos pela febre amarela, que apresenta entre 9-11 dias pos infecção apoptose de células do miocárdio que culmanam em quadros de hipertensão. (6) O flavivirus chega até o baço e levam a quadros de leucopenia e esplenomegalia. (7) Os rins, e a infecção em todos os demais órgãos, leva a produção de citocinas como TNF, IL-2 e IFN alfa e gama, que serão responsáveis por ativar linfócitos TCD4+ e TCD8+, que irão atuar de forma a reduzir a carga viral, combatendo a infecção. Entretanto, a produção de citocinas também pode levar a dano microvascular, gerando uma hipotensão e hemorragia, culminando em pré-insuficiencia renal e necrose dos túbulos renais entre 9-11 dias pós-infecção. Todos esses danos teciduais podem culminar em choque, anóxia, acidose metabólica, levando o indivíduo a óbito. Adaptado de Monath, 2001

As primeiras células do tecido hepático a serem infectadas são as células de Kupffer, que são macrófagos residentes. Além disso, existe uma predominância de infecção de hepatócitos na zona intermediária do fígado (Vieira *et al.*, 1983; Monath, 2001). No fígado, são observados microesteatose e esteatose que são característicos da infecção por flavivirus em geral, como o vírus da febre amarela. Conforme o avanço da doença, iniciam-se os achados histológicos como apoptose de hepatócitos e corpúsculos de Councilman-Rocha Lima (acidofílicos) que são característicos da infecção. O dano ao tecido hepático está relacionado à icterícia, principal sinal da febre amarela (Vieira *et al.*, 1983).

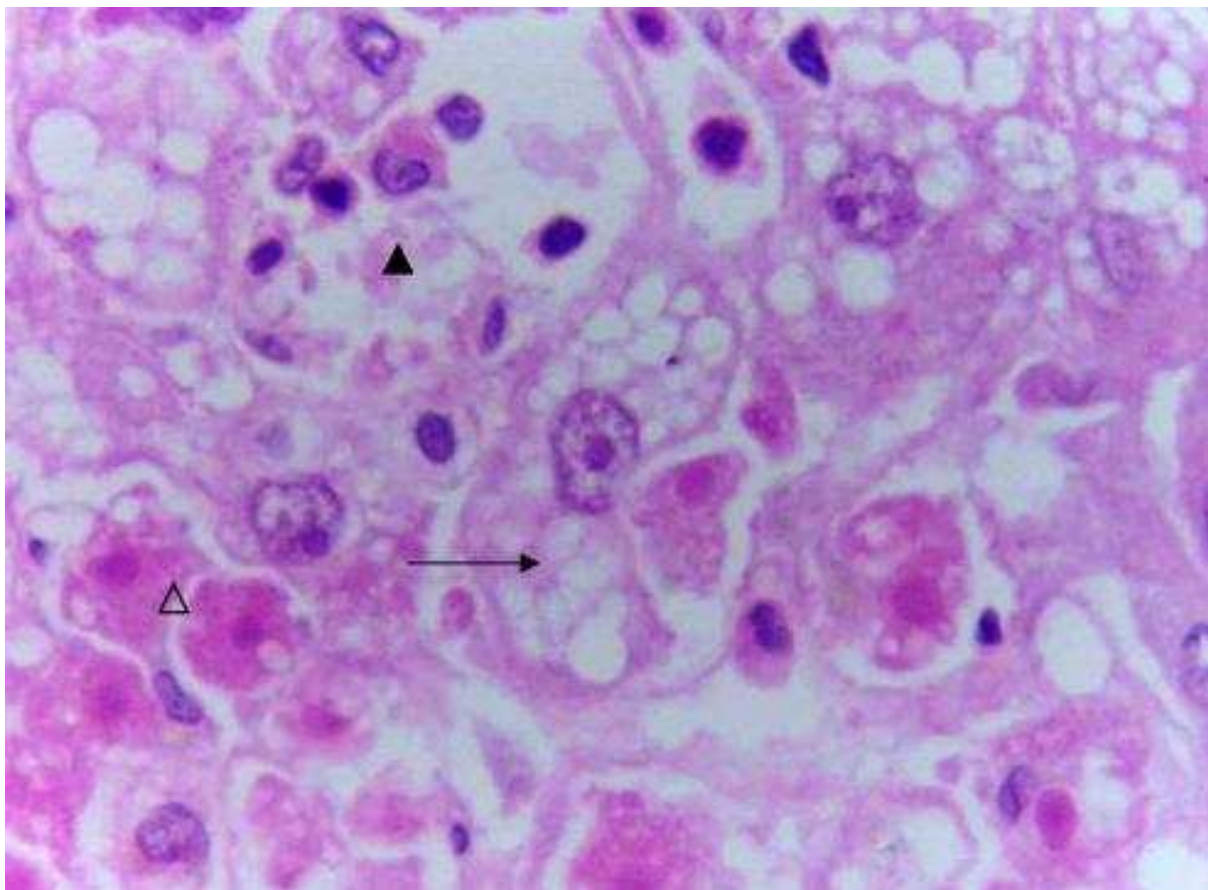
No fígado, a região de maior acometimento é a zona intermediária (zona 2), quando comparado com a zona 1 e 3 (Figura 13). Isto está relatado tanto em casos humanos, quanto em modelos de macacos e hamsters (Quaresma *et al.*, 2013). Em estudos anteriores, propuseram que o vírus da febre amarela possui maior tropismo pelas células pertencentes a zona 2, comprovado pelo maior número de antígenos ali localizados (Hall *et al.*, 1991).



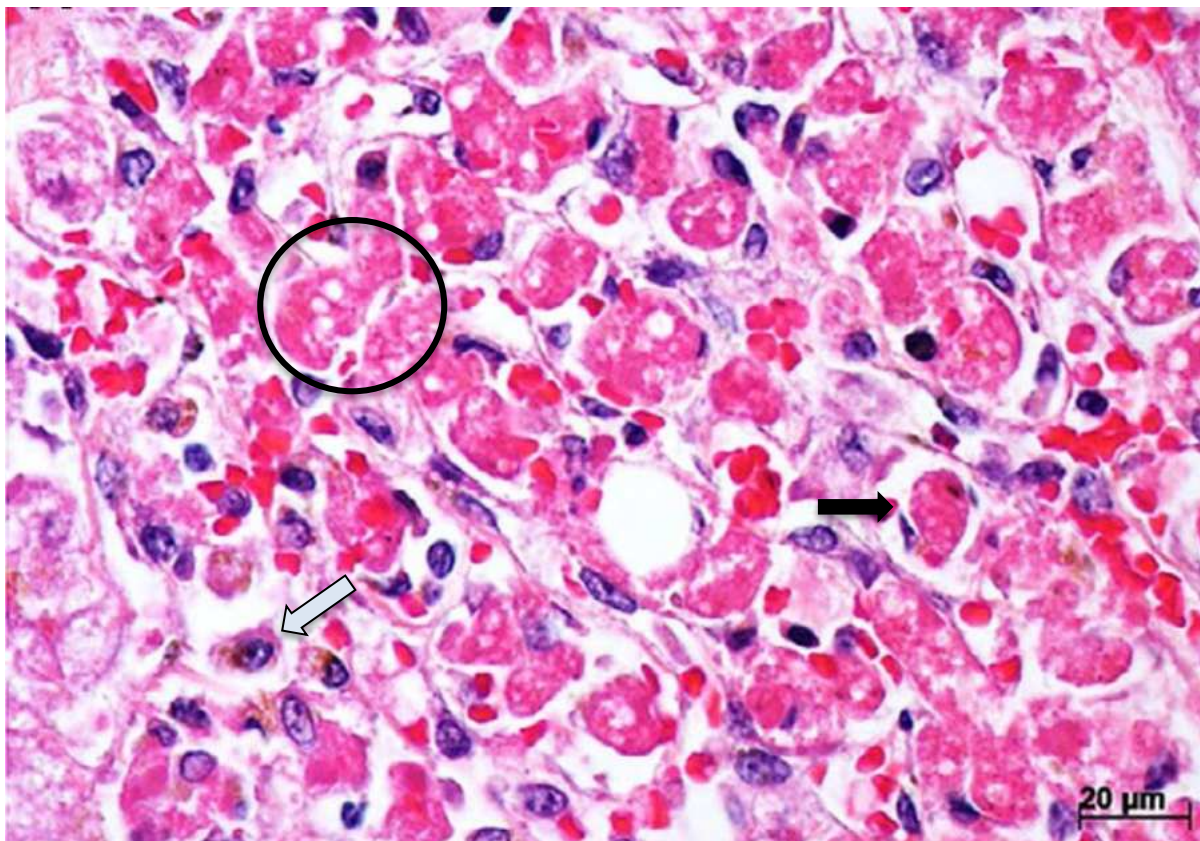
**Figura 13: Ácinos hepáticos evidenciando as zonas do lóbulo.** O tecido hepático pode ser dividido em zonas entre a veia central e duas tríades hepáticas, compostas pela artéria hepática, ducto biliar e veia hepática. A zona 1 é localizada mais próxima as tríades centrais, a zona 2 é a intermediária e a zona 3 é localizada mais próxima a veia central. Retirado de Ross, 2016

Os corpúsculos de Councilman Rocha-Lima, apesar de maior predominância em zona intermediária, são achados histopatológicos hepáticos típicos da febre amarela possíveis de serem observados por todo o tecido (Figura 14 e 15) (Quaresma, Fernandes, *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2006a; Quaresma *et al.*, 2006b; Quaresma *et al.*, 2007). Tanto em humanos quanto nos modelos de macaco *Rhesus* e hamster sírio, apresentam achados patológicos de corpúsculos acidofílicos no tecido hepático (Klotz; Belt, 1930; Monath, 2001; Monath; Barrett, 2003; Quaresma *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2001). Estes achados podem se apresentar como áreas bem definidas de condensação eosinofílica no citoplasma, citoplasma totalmente condensado e eosinofílico com núcleo picnótico, ou como massas com ausência de núcleo dentro de trabéculas ou no lúmen dos sinusóides (Quaresma *et al.*, 2005). Os corpúsculos são hepatócitos em apoptose que são positivos para o antígeno do vírus da febre amarela e para o receptor de morte FAS (Quaresma *et al.*, 2006a; Quaresma *et al.*, 2006b).





**Figura 14: Histologia do fígado de um paciente infectado pelo vírus da Febre Amarela, corado por Hematoxilina e Eosina (400x). Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (triângulo vazio), necrose lítica (triângulo preenchido), esteatose microvesicular (seta). Retirado de Quaresma *et al.*, 2005.**



**Figura 15: Histologia de um fígado de um caso fatal de Febre Amarela submetido a transplante hepático.** Hepatócitos com esteatose (círculo preto) e degeneração acidolífica (Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (seta preta) e hiperplasia das células de Kupffer (seta branca) na região mediozonal). Retirado de Duarte-Neto *et al.*, 2019.

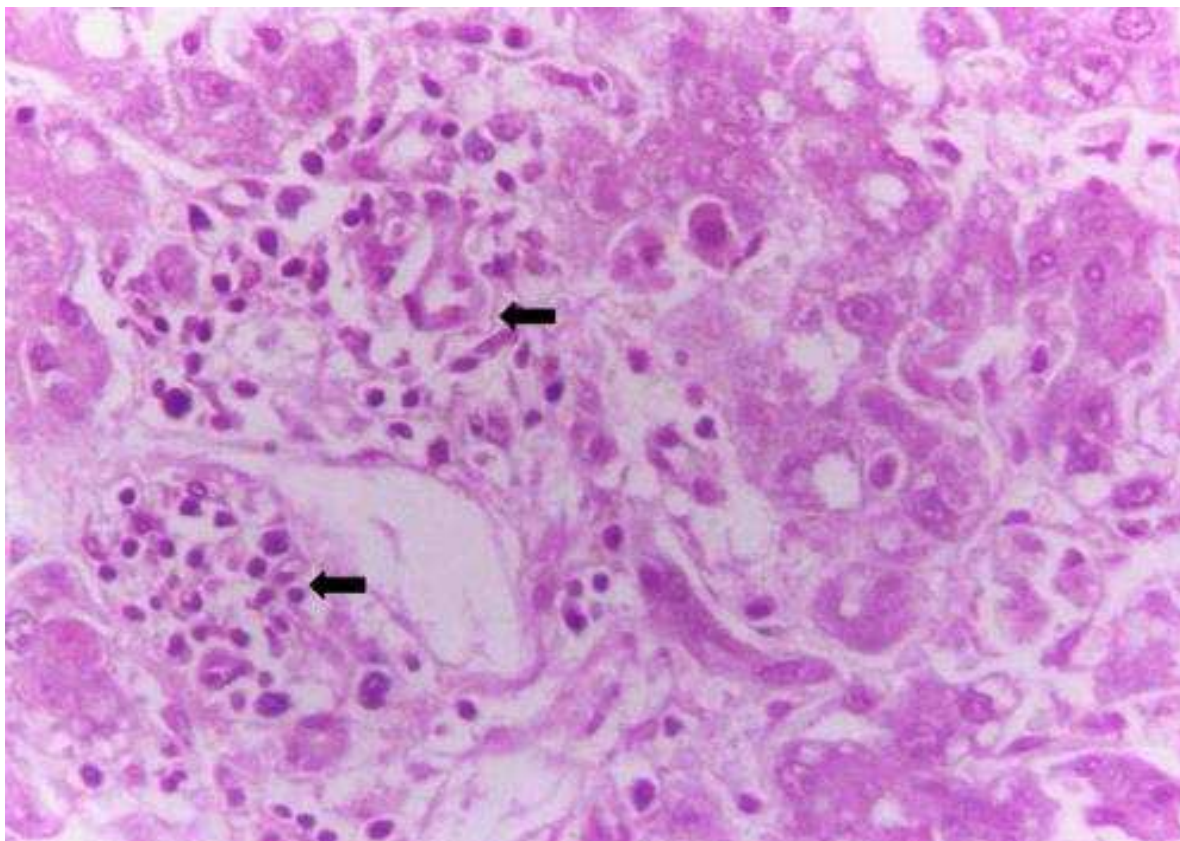
É possível identificar células de Kupffer CD48+, células NK e citocinas como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e TGF- $\beta$  na zona intermediária hepática e no espaço porta dos pacientes que vão a óbito em decorrência da infecção (Quaresma *et al.*, 2006b).

A apoptose é o principal mecanismo de morte celular durante a infecção grave pelo vírus da febre amarela (Quaresma *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2006a; Quaresma *et al.*, 2006b; Quaresma *et al.*, 2007). Além disso, são observados, principalmente na zona intermediária, necrose lítica de hepatócitos em áreas de inflamação por linfócitos e neutrófilos (Klotz; Belt, 1930; Quaresma *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2006b; Quaresma *et al.*, 2007).

A apoptose e a necrose, juntamente com o edema e a esteatose, estão associados a insuficiência hepática que ocorre ao longo da doença grave, o qual também explicam elevados níveis no sangue de alanina e aspartato aminotransferase (Tuboi *et al.*, 2007). Nos hamsters sírios, a lise dos hepatócitos está relacionada com o aumento da apoptose que ocorre ao longo da progressão da infecção (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001).

A esteatose hepática é um achado histológico importante na febre amarela. A esteatose microvesicular (Figura 14) é caracterizada por microgotículas ou aspecto de mórula, enquanto que a esteatose macrovesicular é caracterizada por células em volta de gordura com núcleo excêntrico (Klotz; Belt, 1930; Monath; Barrett, 2003; Quaresma *et al.*, 2005). A esteatose ocorre predominantemente na região intermediária, assim como a necrose, e sua intensidade está atrelada ao estágio de apoptose (Quaresma *et al.*, 2005). Entretanto, é possível detectar sua presença nas zonas 1 e 3 também (Klotz; Belt, 1930; Monath; Barrett, 2003; Quaresma *et al.*, 2005).

No espaço porta, é possível observar infiltrado inflamatório, de intensidade mínima a moderada, com predomínio de linfócitos (linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B CD20+) e monócitos (célula NK). O linfócito CD4+ é o predominante (Figura 16). As citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e TGF- $\beta$ ) também estão presentes no espaço porta e parecem modular a resposta inflamatória (Quaresma *et al.*, 2006b; Quaresma *et al.*, 2013). Entretanto a resposta inflamatória local possui baixa expressão em comparação às lesões nos hepatócitos (Quaresma *et al.*, 2005; Monath, 2005), visto que a ação proteolítica das células do sistema imune sobre as células do estroma e matriz extracelular do fígado é considerada mínima (Strode, 1951). As células de Kupffer, que são as primeiras a serem infectadas pelo vírus da febre amarela, além de apresentarem antígenos para os linfócitos T, liberam TNF- $\alpha$  (Monath, 2001). Nas hepatites pelo vírus da Hepatite B e C, TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$  atuam induzindo apoptose nos hepatócitos. A citocina IFN- $\gamma$ , além do seu papel antiviral, é um importante indutor da ativação de macrófagos, além proporcionar o aumento da expressão de moléculas de MHC tipo I e II, dessa forma, proporcionando uma maior apresentação de antígenos aos linfócitos T e a ligação de células TCD8+ às células do fígado, induzido morte celular por apoptose (Bertoletti, Maini, 2000; Willuweit *et al.*, 2001). Entretanto, em relação ao vírus da febre amarela, o papel de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ainda não são totalmente compreendidos (Quaresma *et al.*, 2006). A citocina TGF- $\beta$  é um forte indutor de morte celular apoptótica no fígado, além de ter a capacidade de inibir a resposta imunitária celular, com isso em mente, acredita-se que essa citocina é muito significativa em casos fatais de febre amarela humana, sendo um importante indutor de danos, o que explicaria uma alta quantidade de células em apoptose em comparação com uma resposta inflamatória fraca que é observada (Quaresma *et al.*, 2006).

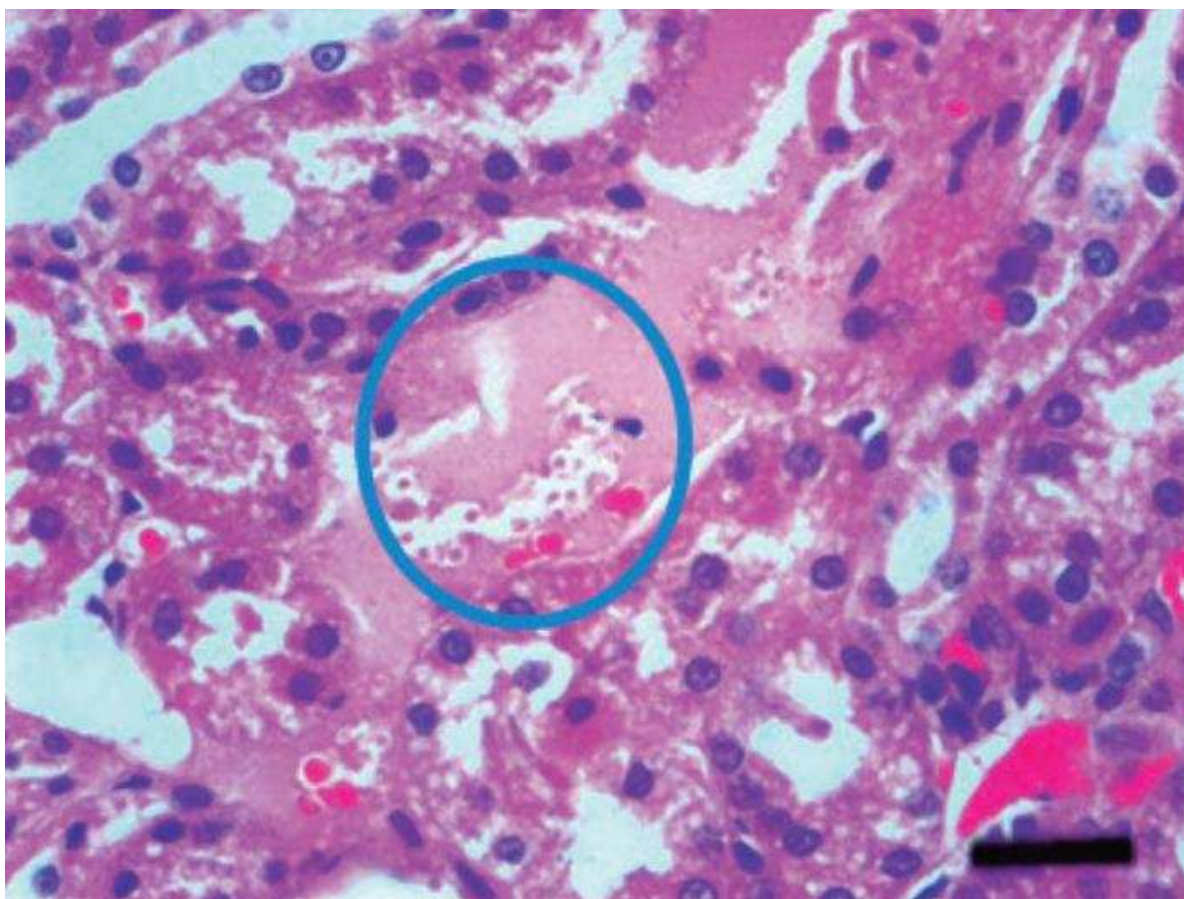


**Figura 16: Histologia do fígado de um paciente infectado com o vírus da Febre Amarela, corado por Hematolixina e Eosina (200x).** Infiltrado inflamatório no espaço porta mostrando células mononucleares e de baixa intensidade (seta). Retirado de Quaresma *et al.*, 2005.

Indivíduos que tiveram a forma grave da doença e se recuperaram, possuem achados histológicos compatíveis com os corpúsculos de Villela, caracterizados por corpúsculos de Councilman Rocha-Lima impregnado com pigmentos biliares (Strode, 1951). Além disso, o fígado dos indivíduos recuperados é totalmente reestruturado (Strode, 1951). O modelo de hamster infectado com cepas africanas adaptadas também apresentou patologia compatível com a doença, com presença de infiltrado inflamatório, esteatose, necroapoptose e corpúsculos acidofílicos (Xiao *et al.*, 2001).

Os rins apresentam epitélio tubular com degeneração eosinofílica severa, microesteatose (Monath; Barrett, 2003) e necrose tubular (Figura 17) (Duarte *et al.*, 2019). A degeneração e necrose tubular também ocorrem no modelo de hamster sírio, apesar deste achado ser inconsistente (Xiao *et al.*, 2001). Através da técnica de imunohistoquímica, foi identificado o antígeno do vírus presente nas células dos rins, sugerindo que estas células estejam participando da replicação viral, e conseqüentemente, propiciando lesão ao tecido epitelial tubular (De Brito *et al.*, 1992). Neste tecido, não é possível observar infiltrado de

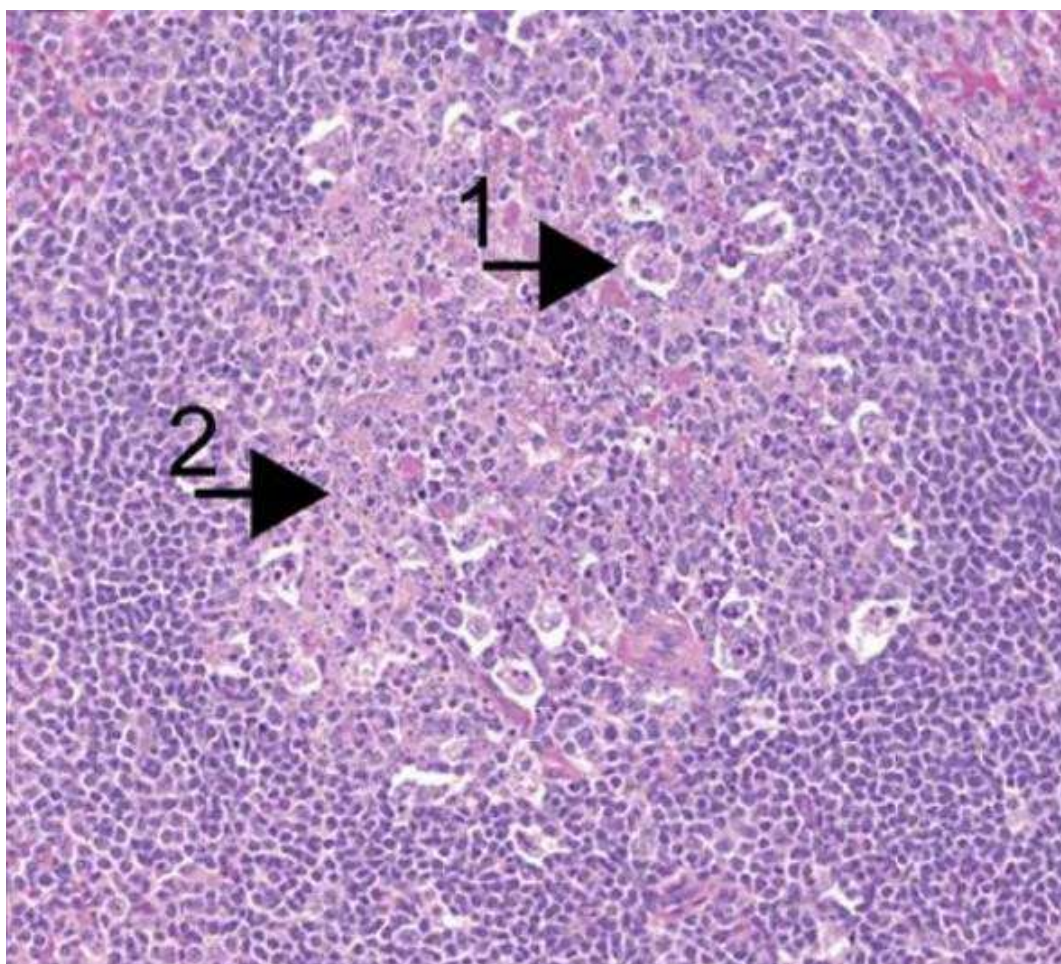
células inflamatórias acentuado (Monath; Barrett, 2003). Os indivíduos que desenvolvem a forma mais grave da febre amarela não apresentam alterações nos glomérulos renais, apesar da detecção de albuminúria (De Brito *et al.*, 1992). Por outro lado, em macacos rhesus ocorre lesões na membrana basal da cápsula de Bowman e é possível detectar o antígeno do vírus presente nos glomérulos renais entre 2 e 3 dpi (Monath; Barrett, 2003), além de também apresentarem edema e necrose tubular (Hudson, 1928). A congestão de vasos sanguíneos nos rins é regularmente encontrada em casos humanos e ocasionalmente encontrada em tecidos de macacos (Hudson, 1928).



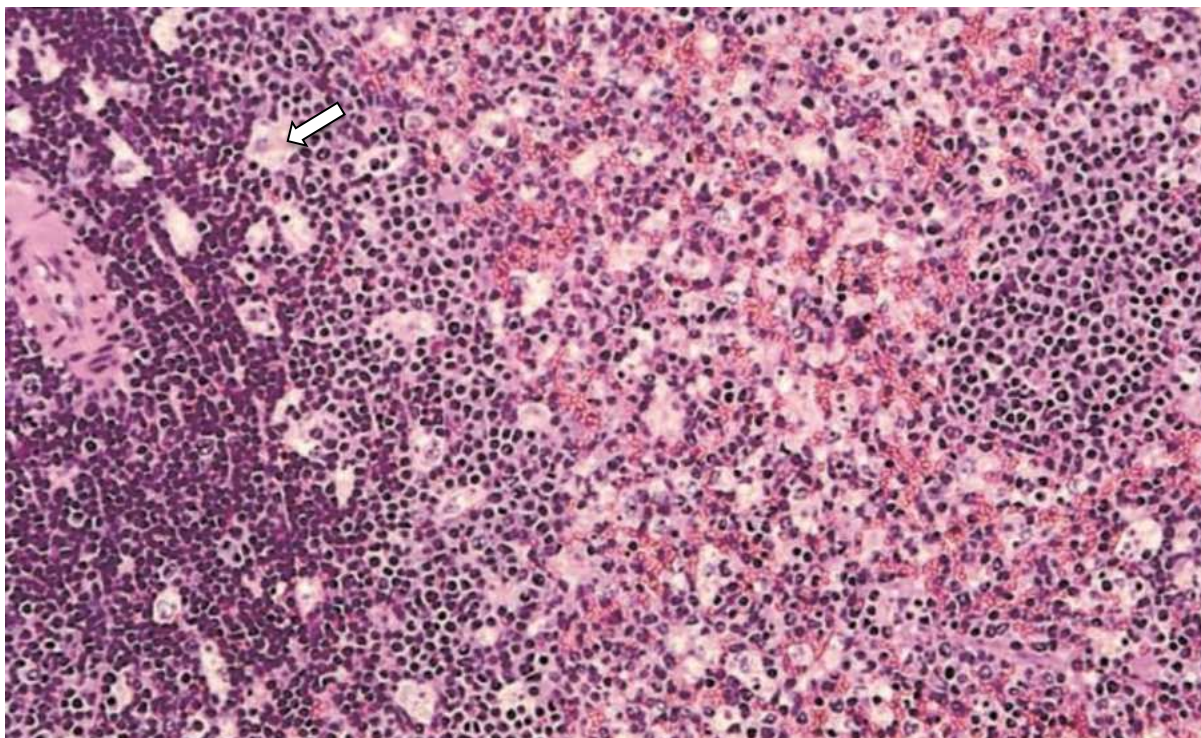
**Figura 17:** Histologia do rim de primata não humano (*Saimiri spp.*) infectado com o vírus da Febre Amarela, corado por Hematoxilina-Eosina (400X). Foco de necrose tubular (círculo azul). Retirado de Ferreira *et al.*, 2020.

No início da infecção no baço, ocorre o surgimento de células mononucleares no interior e ao redor do folículo. Depois, estes folículos se dilatam e ocorre uma redução da quantidade de células linfóides. Posteriormente, os linfócitos desaparecem e ocorre um predomínio de macrófagos. Além do baço, esse processo ocorre também nos linfonodos e

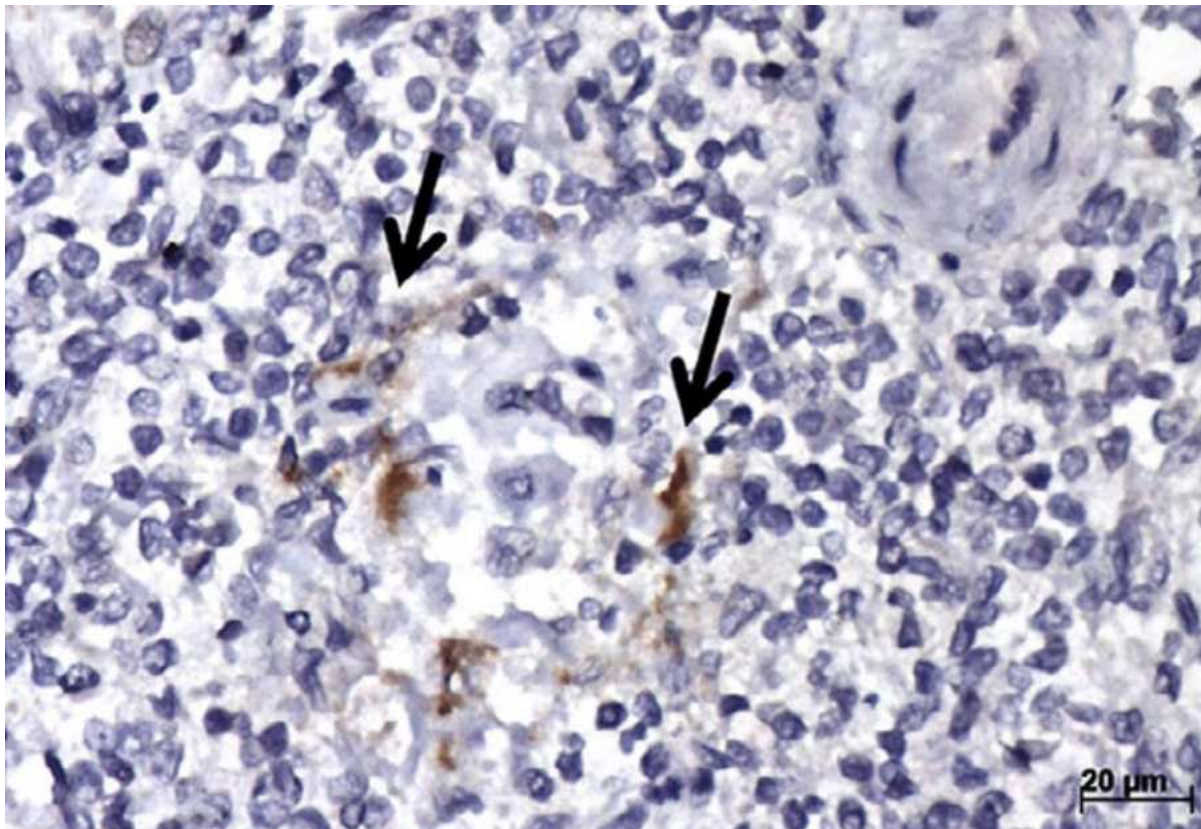
placas de Payer (Klotz; Belt, 1930). A infecção em humanos inicialmente causa leucopenia, principalmente neutropenia com trombocitopenia moderada (Monath; Barrett, 2003). Os achados da necropsia do baço incluem esplenomegalia, congestão e hemorragias (Duarte *et al.*, 2019). Assim como em humanos, o modelo de macaco Rhesus também apresenta congestão, pequenos nódulos linfáticos e um aumento da polpa vermelha (Hudson, 1928). Em modelo de hamster sírio, é possível observar necrose linfocítica e hiperplasia linfoide, caracterizada por uma expansão e depois depleção da polpa branca, esta que foi acompanhada de com o aumento do número de macrófagos esplênicos espumosos (Figura 19) (Xiao *et al.*, 2001). A necrose de linfócitos no centro germinativo do baço (Figura 18) também é proeminentemente observada em macacos infectados experimentalmente (Monath *et al.*, 1981; Engelmann *et al.*, 2014).



**Figura 18: Histologia do baço de macaco Rhesus infectado experimentalmente com o vírus Febre Amarela, corado por Hematoxilina-Eosina. Necrose germinativa no baço. (1) Macrófago ativado e (2) apoptose. Retirado de Engelmann *et al.*, 2014.**

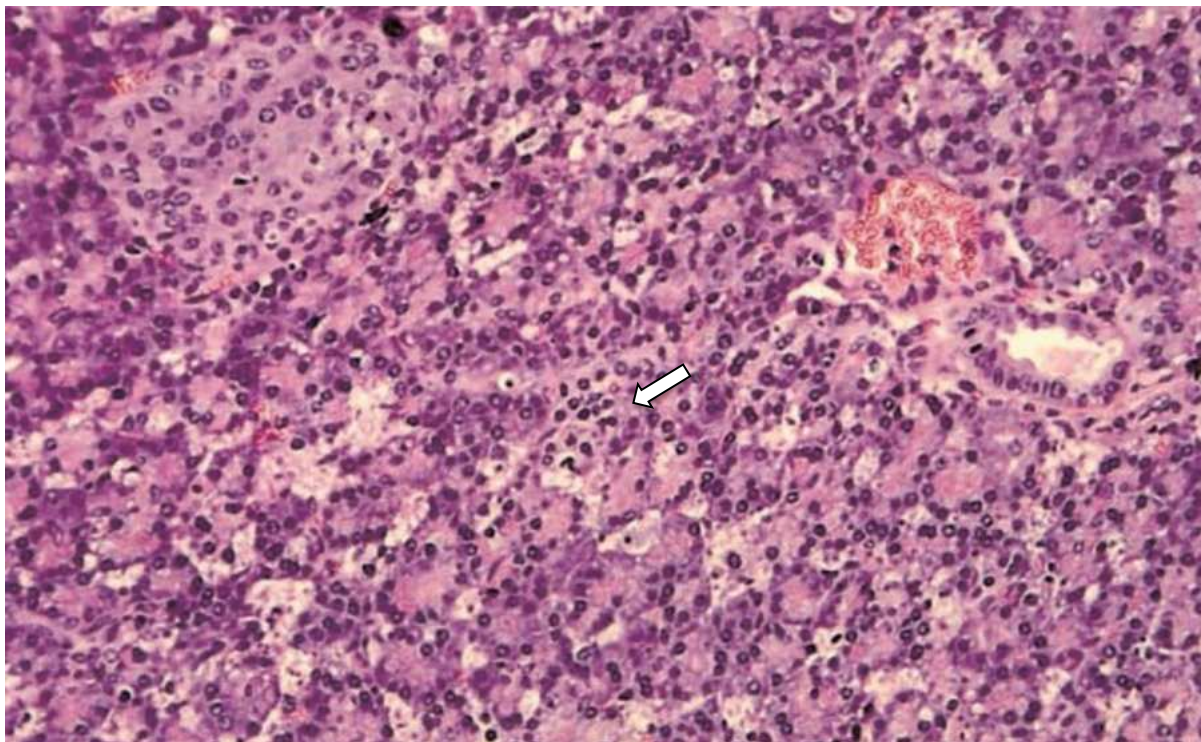


**Figura 19: Histologia do baço de Hamster sírio infectado com vírus da Febre Amarela, corado por Hematoxilina e Eosina.** Encolhimento dos folículos linfóides com o aumento de macrófagos esplênicos espumosos (seta branca). Retirado de Xiao *et al.*, 2001.



**Figura 20: Histologia do baço de caso fatal de Febre Amarela humana.** Detecção do antígeno do vírus da febre amarela em células mononucleares no centro germinativo esplênico. Retirado de Duarte-Neto *et al.*, 2019.

Por outro lado, o pâncreas não é comumente afetado em PNH e humanos (Hudson, 1928), apenas em hamster que foi observado necrose parenquimatosa (Xiao *et al.*, 2001) (Figura 21).



**Figura 21: Histologia de pâncreas de Hamster sírio infectado experimentalmente com o vírus Febre Amarela, corado com Hematoxilina e Eosina (100x).** Necrose do parênquima acinar. Retirado de Xiao *et al.*, 2001.

Apesar da febre amarela ser uma doença descoberta há muitos anos, diversos aspectos sobre a sua patogênese e patologia ainda são desconhecidos (Quaresma., *et al* 2013).

## 1.7. Modelos animais de estudo da Febre Amarela

### 1.7.1. Primatas não humanos

Os PNHs são hospedeiros naturais da doença e podem atuar como reservatório e amplificadores do vírus da febre amarela em áreas endêmicas (Julander, 2016). A infecção



experimental, assim como a análise de animais mortos em epizootias, permite o estudo da febre amarela no seu hospedeiro natural.

As espécies de PNHs oriundas da África (especialmente os que ocorrem em áreas endêmicas) possuem maior tolerância comparada com as espécies da América (Rodhain, 1991), por isso, estes animais apresentam poucos sintomas além de febre e viremia. Entretanto, os PNHs africanos, por apresentarem alta viremia, atuam na manutenção do ciclo silvestre, como hospedeiros amplificadores (Beasley; McAuley; Bente, 2015; Monath *et al.*, 2015). Já os PNHs neotropicais, como macaco bugio (*Alouatta spp.*) e macaco-de-cheiro (*Saimiri spp.*), são suscetíveis à infecção pelo vírus da febre amarela, e casos de epizootias fatais nestes primatas do novo mundo, são um alerta da circulação do vírus e possível infecção em humanos (Sacchetto *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). O surto de 2016-2019 também foi significativo para os PNHs do novo mundo, com 2590 infecções (Sacchetto *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Os PNHs africanos possuem maior tolerância ao vírus da febre amarela comparado aos PNHs neotropicais, porque o vírus teve a sua introdução recente nas Américas, em torno de 400 anos atrás (Bryant *et al.*, 2007), dessa forma, o vírus se mostra mais letal nestas espécies do que nos hospedeiros originais oriundos da África, que coevoluiram com o vírus (Hanley *et al.*, 2013).

Dentre os PNHs, o macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) é considerado o melhor modelo de estudo, e possui a maioria dos dados de estudos de patologia de febre amarela. A experimentação com macaco Rhesus começou em 1928, e partir deste momento, o modelo é utilizado a fim de compreender os aspectos clínicos, biológicos, imunológicos e fisiopatológicos da febre amarela (Monath *et al.*, 1981; Engelmann *et al.*, 2014). Além disso, a fim de facilitar o estudo sobre a patogênese da febre amarela e a avaliação de segurança e eficácia da vacina 17D, foram utilizados macacos Rhesus, o qual foram submetidos a passagem inicial e caracterização de isolados de vírus da febre amarela (Stokes; Bauer; Hudson, 1928; Lloyd; Theiler; Ricci, 1936). A doença desenvolvida neste animal é muito similar, embora mais grave, à doença desenvolvida no ser humano, no qual órgãos como fígado, rins, baço, pulmões, trato gastrointestinal e bexiga são significativamente afetados, caracterizando um modelo ideal de pesquisa (Julander, 2016). Os animais evoluem ao óbito 5 dpi depois de um período de febre alta. Poucos antivirais foram testados contra a febre amarela no modelo de PNHs (Monath, 2008).

Apesar de representar um modelo ideal, com patologia similar à humana e resposta imunológica intacta, utilizar PNHs se torna laborioso, custoso e requer instalações

especializadas e treinamento. Além disso, o número de animais se torna limitado devido a restrições éticas da experimentação e uma rígida regulamentação (Shinde *et al.*, 2022).

### 1.7.2. Camundongo

Os camundongos são naturalmente resistentes à infecção por flavivírus, pois possuem um determinante genético, mapeado para o gene 2'-5'-oligoadenilato sintetase 1b (Oas1b) (Perelygin *et al.*, 2002). Este gene é da família oligoA sintetase 2'-5', agrupado no cromossomo 5. A proteína codificada por esse gene participa no sistema OAS/RNase L, o qual é regulado por interferon, responsável por mediar a degradação do RNA com atuação na ação antiviral no sistema imunológico inato de camundongos (Natiocinal Library of Medicine, 2023). Além disso, uma versão truncada deste gene foi encontrada em linhagens de camundongos de laboratório suscetíveis, enquanto que o gene completo conferia resistência a flavivírus (Perelygin *et al.*, 2002).

Durante a infecção no hospedeiro natural, a proteína NS5 inibe a sinalização do interferon se ligando a proteína STAT-2, promovendo a degradação (Laurent-Rolle *et al.*, 2014). No entanto, a STAT-2 de camundongos é resistente a esse mecanismo, dessa forma, a sinalização de interferon não é inibida e o vírus é eliminado por IFN. Dessa forma, a STAT-2 de camundongos confere uma importante função na resistência de camundongos ao vírus da febre amarela, o que limita a utilização desse modelo no estudo da febre amarela (Laurent-Rolle *et al.*, 2014).

Além disso, assim como para o vírus da febre amarela, outros flavivirus como o vírus da dengue e zika, a NS5 viral se liga a STAT-2 humana mas não à STAT-2 murina, que faz parte da via de IFN tipo 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ). Entretanto, para o vírus da dengue e zika, estudos mostram que a NS5 destes vírus foi capaz de interagir com STAT-2 humana em células murinas tratadas com IFN- $\alpha/\beta$ , o que não foi possível com o vírus da febre amarela (Miorin *et al.*, 2019). Isto ocorre em decorrência da necessidade da poliubiquitinação K6 dependente de IFN tipo 1 em células humanas, que não ocorre em células de camundongos, que é necessária para a ligação de NS5 do vírus da febre amarela à STAT-2. Dessa forma, os camundongos se demonstram limitantes para o estudo da patogênese de flavivírus, como o vírus da febre amarela (Miorin *et al.*, 2019).

Por outro lado, o uso de modelos de camundongos permite testar a melhor segurança e eficácia protetora de vacinas. A injeção intracerebral é capaz de fornecer informações sobre o potencial neurotropismo de vacinas feitas com vírus atenuado. O teste de segurança de novos lotes de sementes de trabalho (WSL) da vacina 17D é realizado rotineiramente em camundongos para verificar a segurança antes da avaliação em PNHs e humanos (Moulin *et al.*, 2013).

Os camundongos possuem uma alta disponibilidade de reagentes e linhagens de animais bem definidas. Além disso, possuem um tamanho pequeno e alta disponibilidade de animais. É considerado um modelo animal acessível economicamente e são de fácil manuseio (Shinde *et al.*, 2022). Por estes fatores, diversos estudos buscam utilizar modelos geneticamente modificados suscetíveis a infecção ou estudam tentativas de adaptar o vírus a este modelo (Julander, 2016).

São utilizados modelos de camundongos deficientes nas principais vias de antivirais. Estes animais são suscetíveis a infecção por cepas atenuadas de febre amarela. Os camundongos deficientes para o receptor de IFN- $\alpha/\beta$  e IFN- $\gamma$  (AG129) são mais suscetíveis a infecção pelo vírus da febre amarela e desenvolvem a doença viscerotrópica, além da neurotrópica (Meier *et al.*, 2009). Entretanto, ao utilizar modelos deficientes, não é possível ter uma resposta imunológica fidedigna ao comparar com modelos imunocompetentes, pois a sua resposta imunológica inata é comprometida (Julander, 2016). Os estudos até o momento para o estabelecimento de um modelo viscerotrópico letal em camundongos imunocompetentes não obtiveram sucesso (Shinde *et al.*, 2022).

### **1.7.3. Hamster sírio**

Hamsters, assim como o camundongo e roedores em geral, também possuem resistência intrínseca a flavivírus, devido a sua resposta de IFN (Perelygin *et al.*, 2002), dessa forma, necessitando de um vírus adaptado (Tesh *et al.*, 2001). Entretanto, o hamster sírio se mostrou um hospedeiro suscetível à infecção pelo vírus da febre amarela. Em estudos anteriores foram feitas adaptações em duas cepas, Jimenez (p.10) e Asibi (p.7), por passagens seriadas. Em 2001, Tesh e colaboradores estabeleceram um modelo de hamster sírio para a cepa Jimenez, após 10 passagens seriadas (Jimenez p.10). Neste trabalho, os animais apresentaram, viremia detectável em 24h pós-infecção, permanecendo por até seis dpi; manifestações clínicas de

letargia, perda de apetite e pelo eriçado (5-6 dpi); necrose hepática (3 dpi) e alteração da função hepática (4-6 dpi), com regeneração a partir do 8º dpi. Ademais, foi feita a adaptação da cepa Asibi após 7 passagens seriadas (Asibi p.7), na qual os resultados clínicos, histopatológicos e laboratoriais foram semelhantes aos obtidos pela cepa Jimenez (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Sbrana *et al.*, 2006).

Em estudos anteriores, foi feita a análise da sequência completa destas cepas adaptadas, no qual foram identificadas regiões determinantes para o fenótipo viscerotrópico da infecção. Klitting e colaboradores (2018) descobriram mutações em E27 (Q → H) e E155 (D → A), presentes na proteína E do envelope viral. Tais mutações foram capazes de proporcionar uma maior virulência e replicação viral *in vivo*. A mutação de E155 isoladamente foi capaz de modificar o fenótipo do vírus em hamster sírio, a qual a cepa aumentava sua eficiência de replicação e tornava-se virulenta neste modelo, com aumento de sinais clínicos e letalidade de 100% (Klitting *et al.*, 2018). Existem interações polares feitas por Q27 e D155 que são importantes para a conformação proteica do envelope, dessa forma, os estudos confirmam que esta mutação em E155 foi crucial para uma base estrutural com o fenótipo virulento em modelo de hamster sírio (Klitting *et al.*, 2018).

A partir da investigação histológica foram observados a presença de corpúsculos acidofílicos nos fígados dos animais infectados com as cepas adaptadas, achado que é característico na infecção pelo vírus da febre amarela tanto em casos fatais humanos como em macacos Rhesus (Xiao *et al.*, 2001). Ademais, a cepa Jimenez p.10 foi capaz de induzir a necrose maciça de hepatócitos, esteatose microvesicular e elevados níveis de aspartato sérico (AST) e alanina aminotransaminase (ALT), achados consistentes com a febre amarela humana (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). A cepa Asibi p.7 causou alta viremia, doença grave e viscerotrópica e levou a óbito hamsters subadultos 8 dpi (McArthur *et al.*, 2003). Foi realizada a caracterização molecular destas duas cepas. A Jimenez p.10 possui cinco alterações de nucleotídeos que codificam duas substituições de aminoácidos nas proteínas não estruturais NS3 e NS5 (McArthur *et al.*, 2003). Por outro lado, a cepa Asibi p.7 possui quatorze alterações de nucleotídeo codificando uma substituição de sete aminoácidos, nos quais cinco estão presentes na proteína do envelope (McArthur *et al.*, 2003).

A utilização de hamsters permite que os estudos *in vivo* sejam realizados em um sistema animal pequeno, ao invés de PNHs. Além disso, a patologia neste modelo é semelhante à patologia de PNH, que é considerado o melhor modelo animal para a investigação de febre

amarela. Os hamster, ao contrário dos camundongos, não precisam da modificação do modelo. Além disso, em comparação ao PNH, os hamsters são uma alternativa menos custosa, menos laboriosa, de mais fácil manutenção e que envolvem menos trâmites regulatórios para a sua utilização em estudos.

## 2. JUSTIFICATIVA

A febre amarela ainda é um problema de saúde pública, sobretudo em regiões da América do Sul e da África Subsaariana, principalmente, devido a uma baixa cobertura vacinal (CDC, 2018; Kaul *et al.*, 2018). Além disso, indivíduos não vacinados eventualmente se infectam e não existe tratamento para esses pacientes, assim como, indivíduos que se vacinam, possuem o risco de desenvolver eventos adversos graves ligados a vacina (Barrett; Teuwen, 2009; Pulendran, 2009; Rowland; Plackett; Smith, 2012). Diversos aspectos da patogênese e da fisiopatologia da febre amarela ainda precisam ser elucidados, dessa forma, faz-se necessário o estabelecimento de novos modelos animais (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003). Assim como desenvolver novas vacinas que possam ser aplicadas em imunocomprometidos e alérgicos a ovos, e desenvolver drogas antivirais para o tratamento da doença, que ainda não existe. Dentre os modelos animais experimentais disponíveis, o macaco Rhesus é considerado o melhor modelo animal de estudo para a febre amarela. Entretanto, a sua utilização é custosa, de difícil manuseio e envolve diversas questões éticas e regulamentações que limitam os estudos neste modelo (Tesh *et al.*, 2001). Nesse sentido, a utilização de modelos animais de menor porte, como roedores, se torna uma alternativa menos custosa, de mais fácil manuseio e manutenção. Como o modelo de camundongos imunocompetentes não desensolvem a doença viscerotrópica, nesse viés, hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) que já foram utilizados em estudos de febre amarela com cepas adaptadas, no qual os animais apresentaram patologia hepática compatível com a apresentada em humanos, seria um potencial bom modelo de estudo da febre amarela (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Sbrana *et al.*, 2006; Miorin *et al.*, 2019).

Além disso, estudos anteriores evidenciaram que cepas circulantes no Brasil, como a PR4408, possuem polimorfismos que influenciam na transmissão e virulência do vírus, como menor sensibilidade a IFN tipo I, maior neurovirulência em camundongos Balb/c e maior citotoxicidade em células de mamífero (Furtado *et al.*, 2022). Ademais, a vacina contra a febre amarela possui uma potência de neutralização significativamente menor nas cepas circulantes no

Brasil quando comparada às cepas africanas (Haslwanter *et al.*, 2022). Adicionalmente, nosso laboratório possui resultados prévios que sugerem que a cepa PR4408 é capaz de infectar hamsters sírios sem a necessidade de adaptação prévia (dados não publicados). Dessa forma, existe uma necessidade de compreender e estudar melhor essa variante do vírus da febre amarela, a fim de compreender seu potencial de virulência. Dessa maneira, justifica o aprofundamento da infecção do modelo experimental em *Mesocricetus auratus* com cepas circulantes no Brasil.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar as alterações histopatológicas causadas pela infecção experimental do vírus da febre amarela (PR4408) no fígado, baço, pâncreas e rins de Hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*).

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Investigar a presença do material genético do vírus da febre amarela em amostras de fígado de animais infectados e não infectados;
- Caracterizar os achados histopatológicos nos tecidos (fígado, baço, pâncreas e rins) dos animais experimentalmente infectados e não infectados
- Identificar possíveis infiltrados inflamatórios, caracterizando as subpopulações de células e os mecanismos de morte celular envolvidos neste processo.

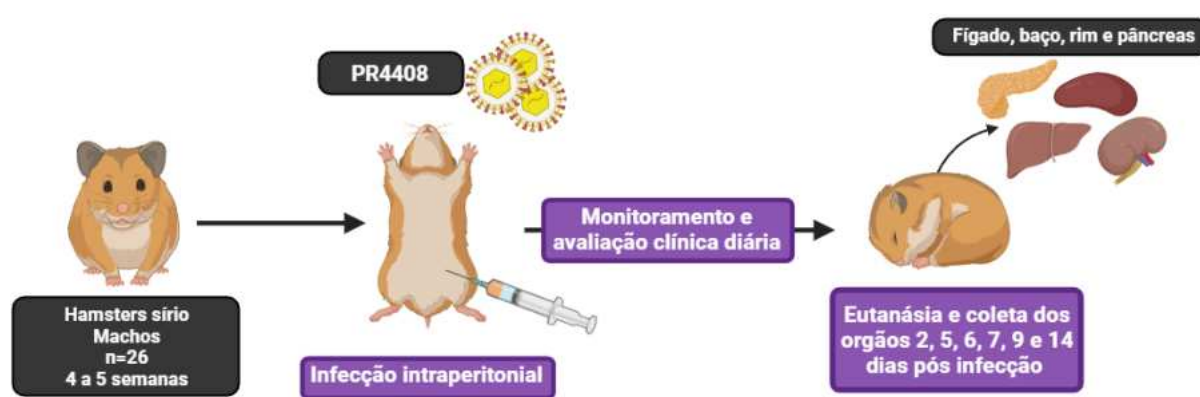
### **4. METODOLOGIA**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA-IOC/Fiocruz) licença CEUA L-023/2021.

#### **4.1. Infecção experimental e análise clínica dos animais**

Vinte e seis *Mesocricetus auratus* foram mantidos em caixas dentro de estantes ventiladas e acompanhados diariamente por médicos veterinários. Os hamsters entre quatro e seis semanas de idade foram inoculados intraperitonealmente com dose única de 100 µL de meio Earle's 199 estéril contendo ou não vírus da febre amarela ( $10^{4-5}$  PFU/mL).

Os animais foram clinicamente avaliados diariamente e eutanasiados em 2, 5, 6, 7, 9 e 14 dpi (Figura 22), utilizando anestésicos cetamina (Syntec, Brasil), xilazina (Syntec, Brazil) e buprenorfina (Ourofino, Brasil). Após a necrópsia, foi realizada a coleta de fígado, baço, pâncreas e rins.



**Figura 22: Desenho experimental da infecção dos hamsters sírios pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela.** Hamster sírios machos (n=26) de 4 a 5 semanas foram submetidos a inoculação intraperitoneal de  $10^{4-5}$  PFU/mL que foram monitorados e avaliados clinicamente todos os dias durante 14 dias. Foi realizada a eutanásia e coleta de fígado, baço, pâncreas e rins em 2, 5, 6, 7 (n=4; 3 animais infectados e 1 controle), 9 e 14 (n=5; 4 animais infectados e 1 controle) dias após a infecção.

Durante a avaliação clínica, o peso dos animais foi medido com uma balança analítica e a temperatura foi medida através de um termômetro infravermelho na região ventral dos hamsters. Ademais, foi feito o teste de força de prensão, o qual consiste em analisar a força das patas traseiras em se manterem firmes no momento que o animal é colocado em uma grade. Além dos parâmetros citados, a respiração, abertura dos olhos, mobilidade e aspecto da pelagem dos animais também foram avaliados diariamente.

**Quadro 1: Parâmetros clínicos avaliados para a determinação do *endpoint* humanitário na ficha de acompanhamento dos animais**

Parâmetro	Pontuação
Perda de peso < 5%	0
Perda de peso de 5 a 10%	3
Perda de peso de 11 a 15%	6
Perda de peso de 16 a 20%	9

Perda de peso $\geq 20\%$	12 eutanásia
Temperatura normal	0
Hipertermia $< 35,2^{\circ}\text{C}$	12 eutanásia
Hipotermia $> 38,9^{\circ}\text{C}$	12 eutanásia
Respiração normal	0
Taquipneia	6
Respiração abdominal	12 eutanásia
Postura corporal normal	0
Leve curvamento	6
Moderado curvamento	9
Severo curvamento	12 eutanásia
Olhos abertos $> 75\%$	0
Olhos com abertura de 50 a 75%	6
Olhos com abertura de 25 a 50%	9
Olhos c/ abertura $< 25\%$	12 eutanásia
Mobilidade - ativo	0
Mobilidade reduzida	3
Ataxia/marcha vacilante	6
Relutante em se movimentar	9
Incapaz de se movimentar	12 eutanásia
Pelagem normal	0
Piloereção discreta	6
Piloereção notória	12 eutanásia
Preensão dos membros traseiros - reativo	0
Preensão dos membros traseiros - pouco reativo	6
Preensão dos membros traseiros - não reativo	12 eutanásia
Paralisia dos membros traseiros - unilateral	6
Paralisia dos membros traseiros - bilateral	12 eutanásia
<b>Outras observações possíveis:</b>	
Cianose de pele e mucosas	12 eutanásia
Coma	12 eutanásia
Convulsão	12 eutanásia
<b>Pontuação:</b>	

Fonte: Guia de finalização humanitária aplicada a roedores utilizados em pesquisa (Silva; Lima, 2023).

#### 4.2. Cepa de Febre Amarela

A cepa do vírus da febre amarela utilizada neste estudo foi a PR4408, relacionada a um grande surto que ocorreu em 2008, no Rio Grande do Sul (RS, Brasil), na fronteira com Uruguai e Argentina, isolada de um macaco bugio do gênero *Alouatta spp.* (Delatorre *et al.*, 2019).



### 4.3. Teste de inóculo por titulação viral

A técnica de titulação viral por *plaque-forming unit* (PFU) foi utilizada para titular os inóculos de infecção dos hamsters sírios. Nessa técnica foram utilizadas células Vero (epitélio de rim de macaco verde) que foram submetidas a diluições seriadas do vírus da febre amarela e incubadas por 7 dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final deste período, foi feita a contagem das placas de lise, em duplicata, e o título viral foi determinado de acordo com a equação:  $T = M \times ID \times FC$ , onde:  $T$  = Título expresso em PFU/mL;  $M$  = Média do número de placas de lise contadas em uma determinada diluição;  $ID$  = Inverso do fator de diluição onde as placas de lise foram contadas;  $FC$  = Fator de correção do inóculo para mL, que corresponde a 10, uma vez que o inóculo (100 µL) é a décima parte de 1 mL.

### 4.4. Extração de RNA dos tecidos pelo Trizol

Após a necrópsia, parte do tecido coletado foi acondicionado em Trizol (Thermo Fischer) e armazenado em freezer -80°C. Foram transferidos 100 mg de tecido para um novo eppendorf, contendo 1 mL trizol. Depois, as amostras foram submetidas a ruptura mecânica, formando um pellet pequeno. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas, por cinco minutos, e foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados mecanicamente e incubados a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 4°C por 15 minutos. O RNA foi transferido para um novo eppendorf contendo 500 µL de isopropanol e 4 µL de poliacrilamida, incubando a 4°C por 10 a 15 minutos. Logo após, os tecidos foram levados à centrífuga para mais um ciclo de 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 1 mL de etanol (EtOH) 75%. Foi iniciada mais uma etapa de centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. O álcool foi retirado e os tubos foram abertos para a evaporação completa. Por fim, o RNA foi ressuspenso em 40 µL de água RNase free.

#### 4.5. Detecção do material genético viral por RT-PCR

Inicialmente, foi feita a desnaturação do material genético. Para isso, foram adicionados 5  $\mu$ L do RNA no mix de desnaturação (Quadro 2) e o material foi levado ao termociclador. As amostras foram aquecidas a 94°C por 2 minutos. Esta etapa foi feita utilizando o *primer* YF-1 (5'-GGTCTCCTCTAACCTCTAG-3'), que reconhece regiões NS5 do RNA. Após a desnaturação, o RNA foi levado para o banho de gelo por 5 minutos.

**Quadro 2: Mix de desnaturação do RNA**

Reagentes	Volume ( $\mu$ L)
Amostra de RNA	5
<i>Primer</i> (YF1)	1
H2O	3

Após o resfriamento das amostras, foram acrescentados nos tubos 10  $\mu$ L por reação do Master Mix (Quadro 3) para obtenção do DNA complementar (cDNA). Cada amostra foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e estas foram incubadas a 52°C por 1 hora.

**Quadro 3: Master Mix para transcrição reversa.**

Reagente	Volume ( $\mu$ L)/reação
Tampão de enzima (5X)	4
H <sub>2</sub> O	1
dNTP (10 mM)	2
DTT (0.1 M)	1
Inibidor de RNase (RNaseOUT)	1(40 U/ $\mu$ L)
RT (Thermoscript – Invitrogen)	1 (15 U/mL)
Volume da reação	20

Após a obtenção da fita de cDNA do vírus da febre amarela, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para tal, foram adicionados 2  $\mu$ L de cada amostra de cDNA a um eppendorf contendo 23  $\mu$ L do Master Mix, (Quadro 4), utilizando o par de iniciador YF1. Em seguida, as amostras foram submetidas a 30 ciclos de reação de amplificação no termociclador. Em um primeiro momento, ocorreu uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos.

Depois, iniciou-se a ciclagem de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 52°C por 50 segundos e a polimerização a 72°C por 50 segundos. Ao final, ocorreu uma última etapa de polimerização a 72°C por 7 minutos. Totalizando 1 hora e 28 minutos de reação.

**Quadro 4: Master Mix para reação em cadeia da polimerase.**

Reagente	Volume (µL)/2 reações
H <sub>2</sub> O	40
Tampão de enzima (10X)	5
Mg <sup>++</sup> (50mM)	1,5
dNTP (10 mM)	1
Primer (YF1 e YF3)	0,5 (de cada primer)
Taq Polimerase	0,4
cDNA	2
Volume da reação	25

#### 4.6. Eletroforese em gel de agarose

Para a visualização dos resultados, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Labtrade, Brasil) a 1,5% corados com Brilliant Green (NeoBio, Brasil). A agarose foi diluída em TBE 0,5X e aquecida até ficar com aspecto translúcido. Ao resfriar um pouco, foram adicionados 8 µL do *Brilliant Green* a ela. A solução do gel foi vertida na cuba até a sua solidificação. Em seguida, foram aplicados 8 µL de amostra e 12 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,003%) em cada poço. Também foi adicionado o peso molecular (Mid Range DNA Ladder - Cellco Biotec, Brasil). As amostras amplificadas pela PCR que foram consideradas positivas possuem a presença de bandas correspondentes a 675 pares de bases (pb).

#### 4.7. Processamento Histológico

Em 2, 5, 6, 7 e 14 dpi, os animais foram eutanasiados e, durante a necrópsia, fígado, baço, pâncreas e rim dos hamsters foram coletados. Foi realizada a fixação com formalina Millonig de Carson (Carson *et al.*, 1973). Os órgãos foram clivados entre 3 e 5 mm de espessura. Em

seguida, os tecidos foram submetidos ao processamento histológico convencional: desidratação, clarificação e impregnação em parafina. Com o auxílio de um micrótomo (Leica), os blocos foram seccionados em uma espessura de 5µm. As lâminas com os cortes seguiram para a coloração de Hematoxilina de Mayer e Eosina-floxina (HE) para a visualização no microscópio de campo claro AxioHOME (Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens foram adquiridas com a câmera digital AxioCam 712 Color (Carl Zeiss, Alemanha).

#### 4.8. Imunofluorescência Indireta

Os cortes (5 µm) foram desparafinizados com xilol, hidratados em álcool (absoluto, 95% e 70%) e lavados com água destilada. A recuperação antigênica dos cortes foi realizada na panela de pressão TintoRetriever Pressure Cooker for HIER (Bio SB) utilizando o tampão Tris EDTA (Imuno Retriever 20x com EDTA; Bio SB) em pH 9,0 ou tampão Citrato (Imuno Retriever 20x com Citrato; Bio SB) pH 6,0, como indicado no Quadro 5. Ao término, as lâminas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com PBS 1X (Thermo Fisher Scientific; REF: 70013073) pH 7,2. Em seguida, foi feita a marcação com o anticorpo primário (Quadro 5).

**Quadro 5: Relação dos anticorpos primários utilizados para imunomarcação.**

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tampão</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>REF</b>
anti-CD3	Camundongo	1 : 100	Tris EDTA	Thermo Fisher Scientific	MA5-12577
anti-CD20	Camundongo	1 : 75	Tris EDTA	Thermo Fisher Scientific	MA5-13141
anti-IBA-1	Coelho	1 : 100	Citrato	Thermo Fisher Scientific	PA5-27436
anti-caspase 3	Camundongo	1 : 200	Citrato	Thermo Fisher Scientific	MA1-91637
Fluído ascítico anti-ptnE-YFV	Camundongo	1 : 100	Citrato	Instituto Evandro Chagas (Belém – PA)	-

Os cortes dos tecidos foram incubados em uma câmara úmida a 4°C overnight. No dia seguinte, foram realizadas lavagens com PBS 1X e foi feita a marcação com o anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 488 IgG anti-camundongo ou anti-coelho, seguindo para

a incubação na estufa a 37°C por 1 hora (Quadro 6). As amostras foram contra-coradas com DAPI e Azul de Evans, e montadas ProLong Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific; REF: P36980). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Axio Observer Z1 equipado com sistema Colibri (Carl Zeiss, Alemanha). Determinados campos foram analisados em microscópio confocal LSM 980 (Carl Zeiss, Alemanha).

**Quadro 6: Relação dos anticorpos secundários utilizados para imunomarcção.**

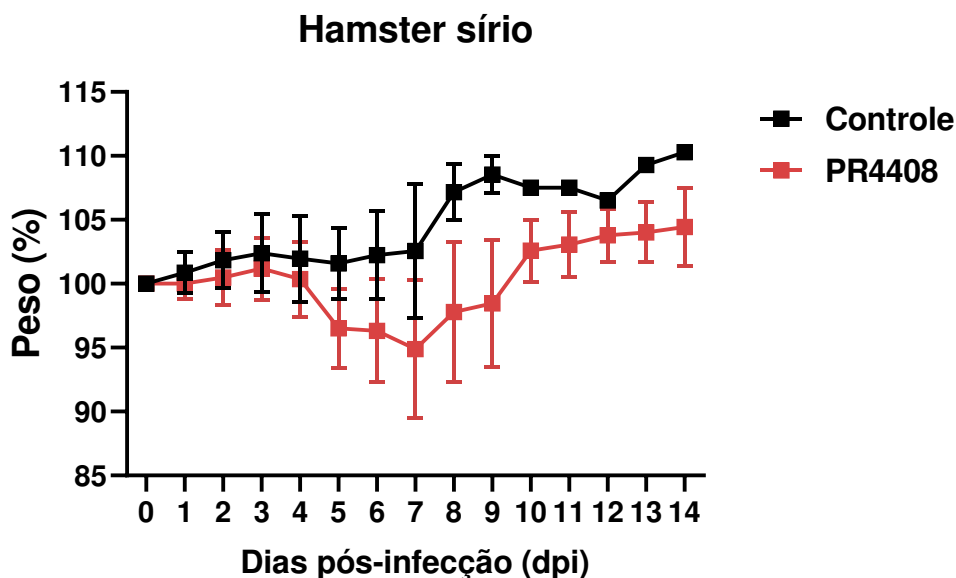
<b>Anticorpo secundário</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>REF</b>
Alexa Fluor 488 anti-camundongo	cabra	1 : 750	Thermo Fisher Scientific	A11001
Alexa Fluor 488 anti-coelho	cabra	1 : 750	Thermo Fisher Scientific	A11008

As amostras foram feitas em duplicata, de forma que uma delas foi destinada ao controle negativo, ao qual foi adicionado apenas o anticorpo secundário, com o intuito de analisar a presença ou não de marcações inespecíficas.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA**

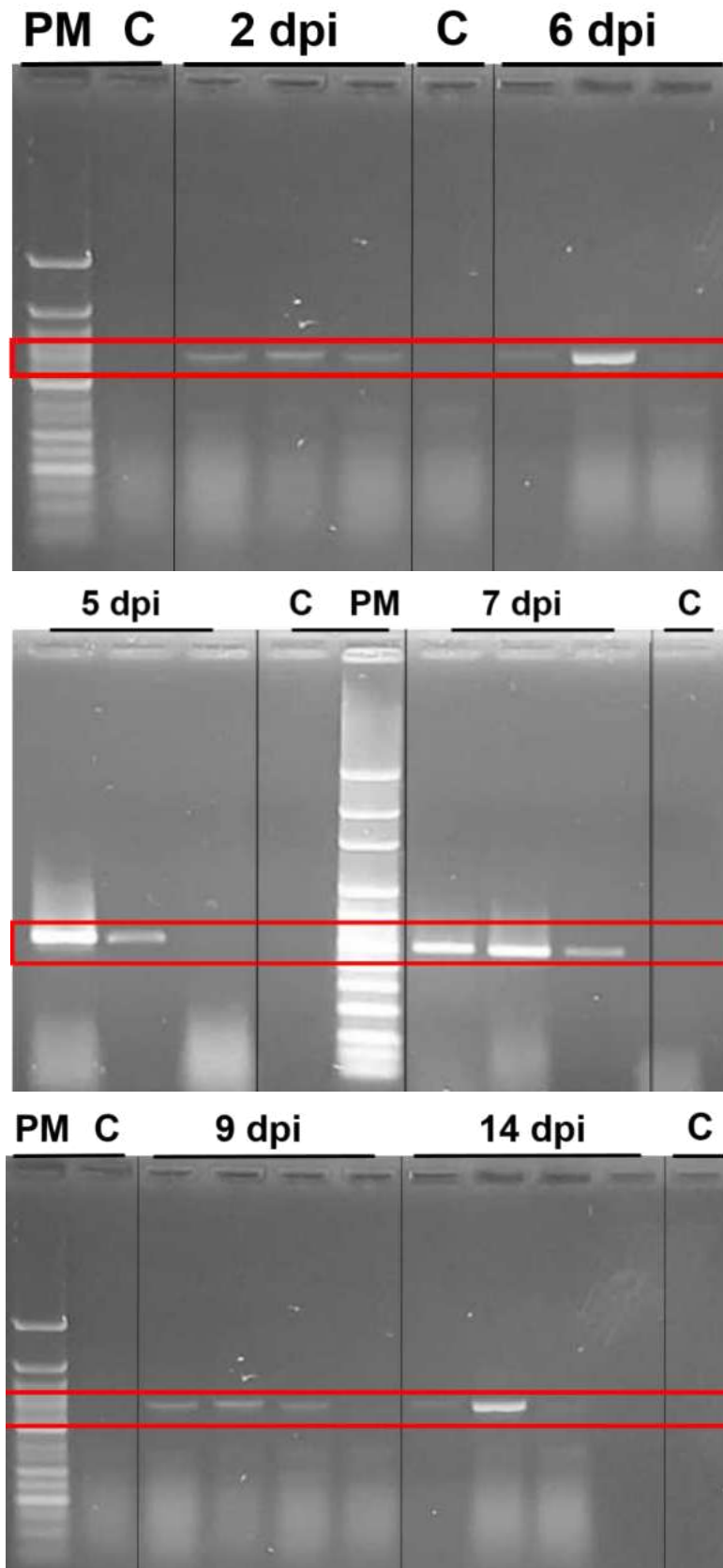
A avaliação clínica dos animais demonstrou que todos apresentaram temperatura, respiração e mobilidade normal durante todo o experimento. Também não foram observadas a presença de letargia e pelo eriçado. Quanto aos parâmetros de postura corporal e abertura dos olhos, apenas um animal apresentou um leve curvamento da postura em 5 dpi e dois animais apresentaram dificuldade em abrir os olhos de 50-75%, um em 4 e 5 dpi, e o outro em 5 e 6 dpi. Entretanto, nenhum animal morreu durante o experimento. Ao realizar a pesagem dos animais, notou-se que os animais infectados pela PR4408 apresentaram perda de peso a partir de 5 dpi, com o pico de perda em 7 dpi. Contudo, os animais retornaram a ganhar peso a partir do 8 dpi, tendo se reestabelecido até 14 dpi (Figura 23).



**Figura 23:** Gráfico da variação do peso em porcentagem de hamster sírios infectados pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela durante 14 dias após a infecção. Os animais começam a perder peso corporal do quarto para o quinto dia após a infecção, com destaque para 7 dpi, e retornam a sua massa corporal até os 14 dpi.

## 5.2. DETECÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA POR RT-PCR

Ao analisar os resultados da corrida de eletroforese em gel de agarose, observou-se que foi possível detectar o material genético do vírus da febre amarela em todos os animais infectados ( $n= 3/3$ ) aos 2 dpi, em dois animais ( $n= 2/3$ ) aos 5 dpi, em um animal ( $n=1/3$ ) aos 6 dpi, em três ( $n=3/4$ ) aos 9 dpi e em um animal ( $n= 1/4$ ) aos 14 dpi. Dois animais infectados em 6 dpi e um animal infectado em 9 dpi apresentaram resultados inconclusivos para a detecção do RNA viral no fígado pela RT-PCR (Figura 24).

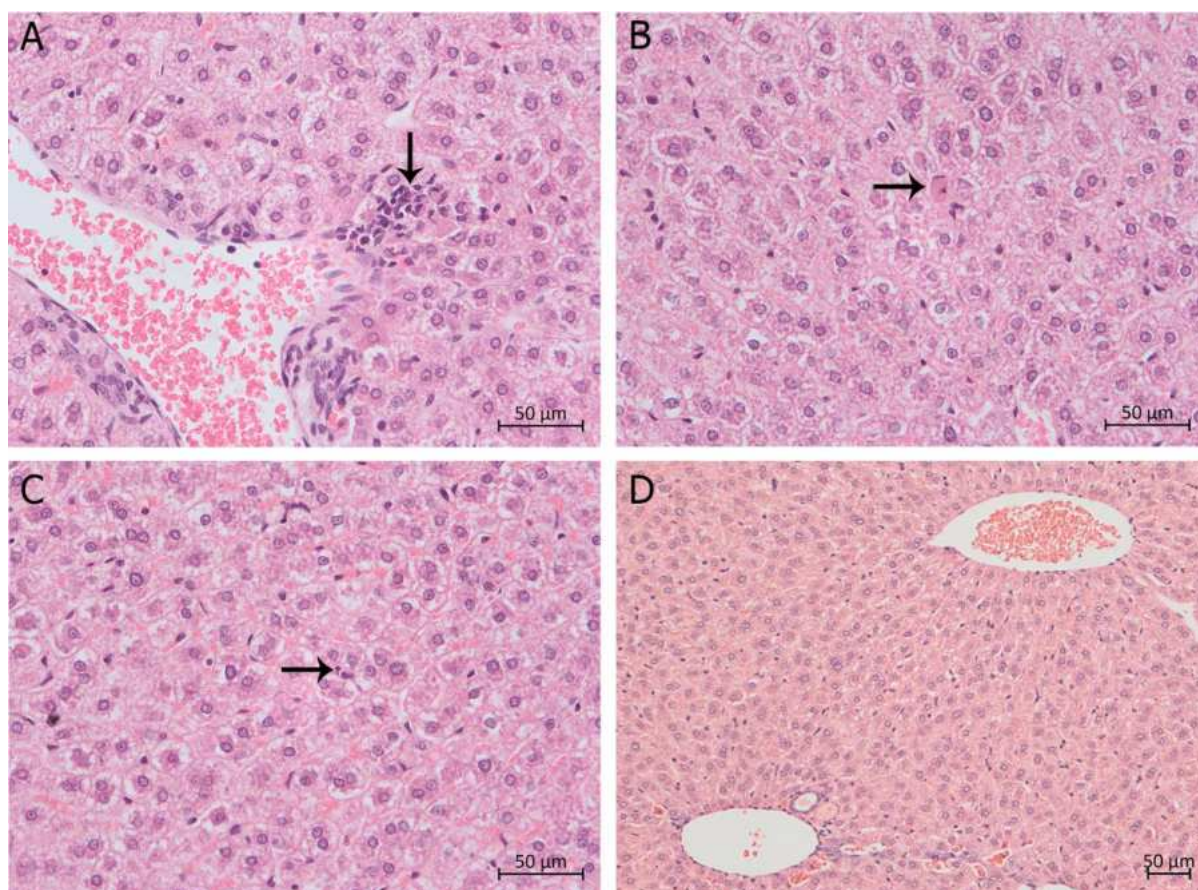


**Figura 24:** Eletroforese em gel de agarose de amostras de fígados de hamsters sírios infectados experimentalmente pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela em 2, 5, 6, 7, 9 e 14 dias pós-infecção. Detecção do material genético viral em três animais em 2 dpi, em dois animais em 5 dpi, em 3 animais em 7 dpi, em três animais em 9 dpi e apenas um animal em 14 dpi. (PM) Peso Molecular. (C) Controle.

### 5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA

#### 5.3.1. FÍGADO

A análise histológica dos fígados dos animais infectados pela cepa PR4408 revelou, em 2 dpi, discretos infiltrados inflamatórios peri-portais (Figura 25 A), e a presença de corpúsculo acidofílico (Figura 25 B) e apoptose de hepatócitos no tecido (Figura 25 C).

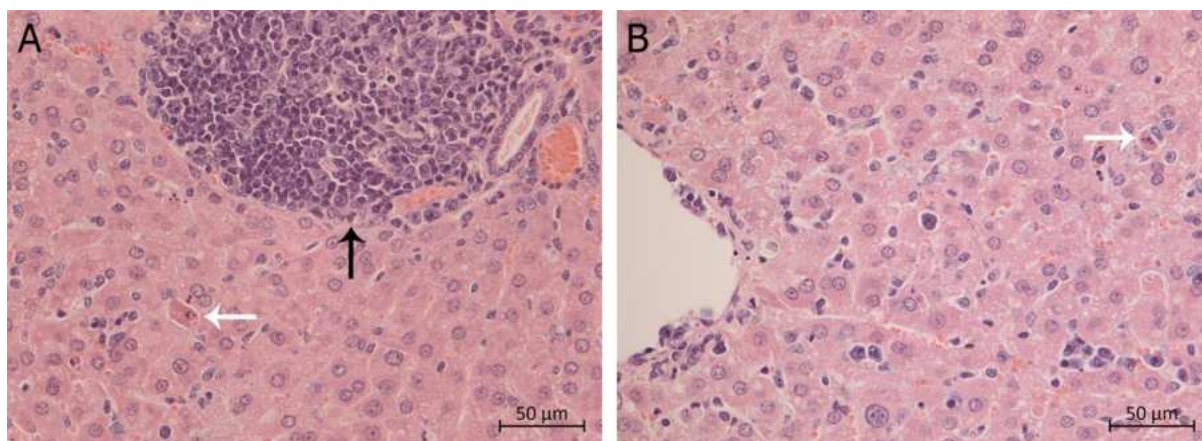


**Figura 25 (A-D):** Secções histológicas de fígado de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 2 dias pós-infecção: (A) Infiltrado inflamatório peri-portal com presença de eosinófilos; (B) Presença de Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (seta preta); (C) Hepatócitos em apoptose com núcleo picnótico (seta preta); (D) Ausência de alterações histopatológicas no animal controle. Figuras A-C em 40x e figura D em 20x.

Na figura a seguir (Figura 26), estão representados os tecidos hepáticos dos hamsters infectados pela cepa PR4408 em 5 dpi. Neste grupo de animais, observou-se a presença de corpúsculos acidofílicos (Figura 26 AB) e apoptose de células com núcleo em cariorrexe.

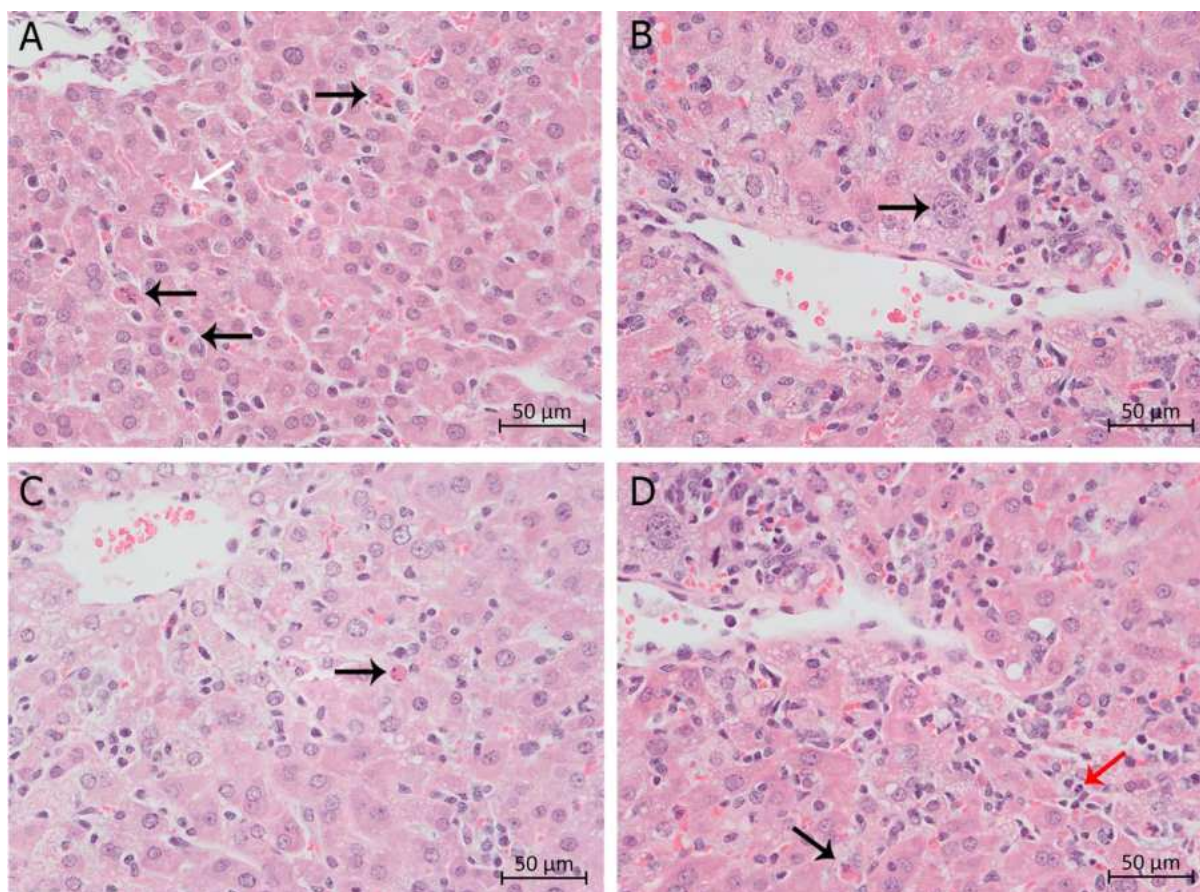


Ademais, também apresentaram infiltrado inflamatório peri-portal (Figura 26 A). O controle apresentava aspecto hepático normal, sem alterações patológicas.



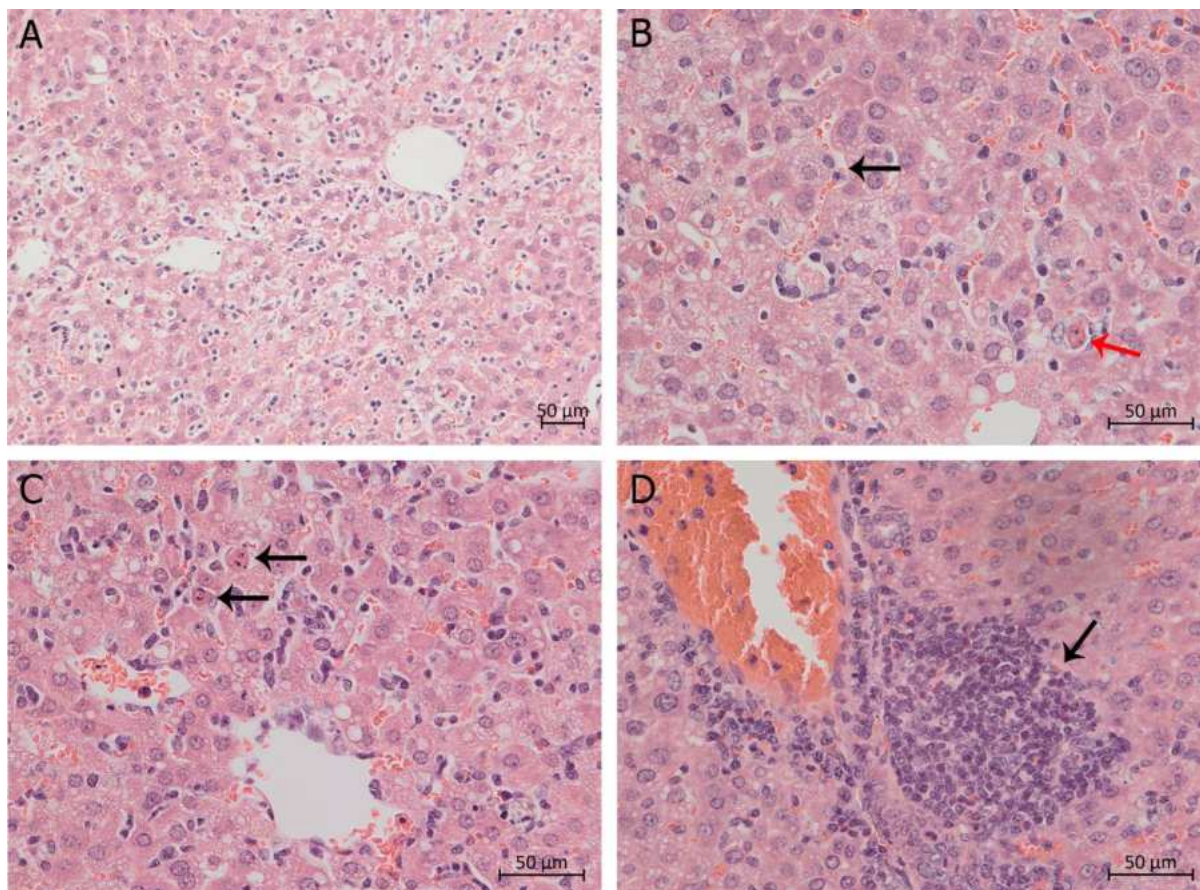
**Figura 26 (A-B):** Secções histológicas de fígado de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 5 dias pós-infecção: (A) Infiltrado inflamatório peri-portal (seta preta) e presença de corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (seta branca); (B) Presença de Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (seta branca). Figuras A-B em 40x.

A análise hepática aos 6 dpi revela a presença de corpúsculos acidofílicos (Figura 27 A e D), apoptose de hepatócitos com células com núcleo picnótico (Figura 27 D) e em cariorrexe (Figura 27 C), área de congestão dos sinusóides (Figura 27 A), degeneração tecidual gordurosa (esteatose) acentuada e a presença de células aberrantes que possivelmente são hepatócitos em exaustão celular que perderam a sua capacidade de divisão (Figura 27 B e D). Estes animais também apresentaram um infiltrado inflamatório peri-portal discretos que também se mostrou presente no controle.



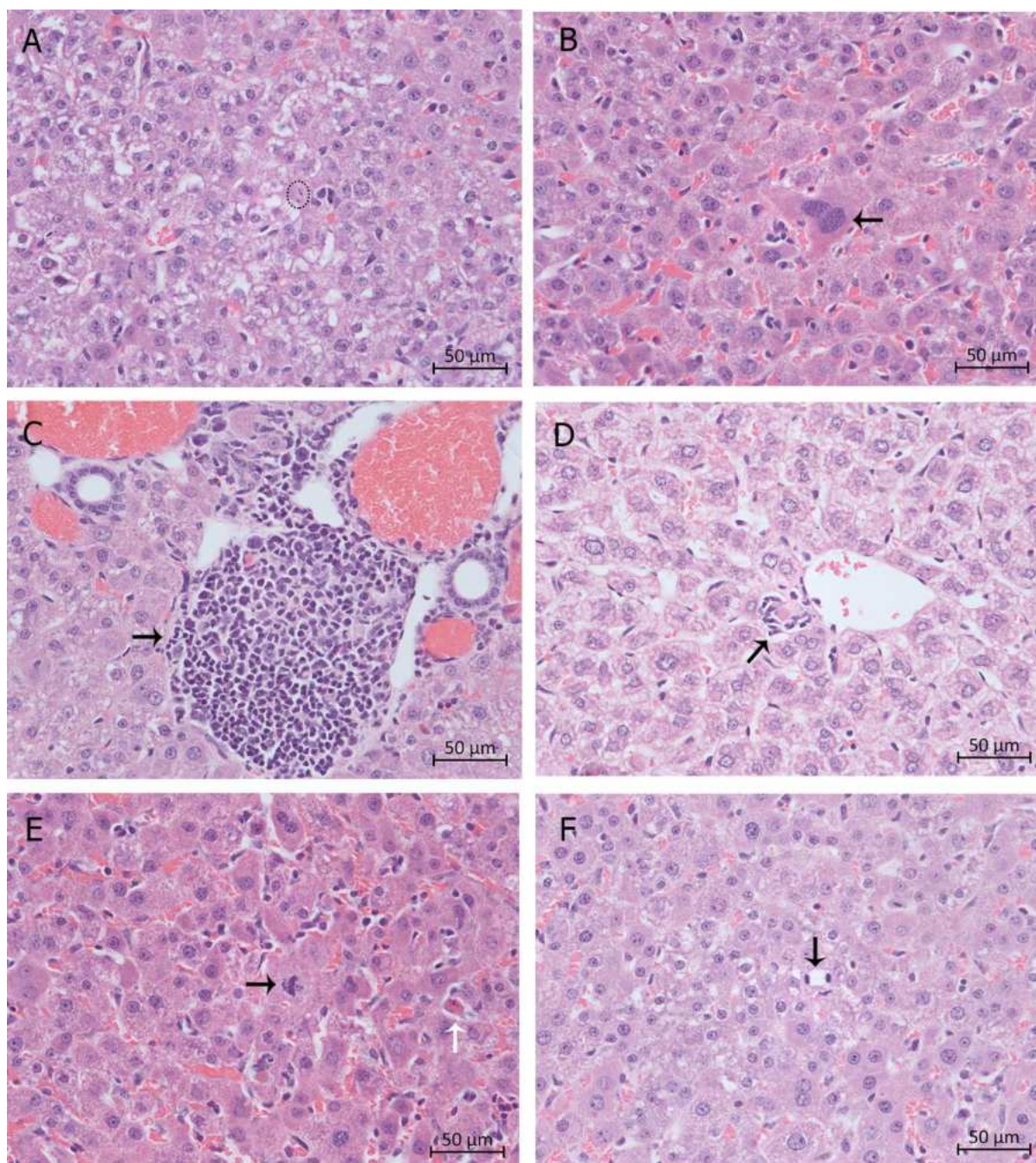
**Figura 27 (A-D):** Seções histológicas de fígado de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 6 dias pós-infecção: (A) Presença de Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (setas pretas) e congestão dos sinusóides (seta branca); (B) Presença de célula aberrante (seta preta) e degeneração gordurosa; (C) Corpúsculo acidofílico com o núcleo emcariorrexe (seta preta); (D) Presença de Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (seta preta) e hepatócitos em morte celular em picnose (seta vermelha). Figuras A-D em 40x.

Na figura 28, estão representados os achados histopatológicos dos fígados dos hamsters sírios infectados pela cepa PR4408, em 7 dpi. Nestes animais, a presença de corpúsculos acidofílicos e de áreas de microesteatose foram presentes e recorrentes em todos os animais (Figura 28 BC). Além disso, observou-se áreas de vacuolização citoplasmática e necroapoptose (Figura 28 A). Ademais, todos os fígados apresentaram um infiltrado inflamatório peri-portal acentuado (Figura 28 D). Foi observado também a presença de congestão dos sinusóides (Figura 28 B), além da presença de células em cariorrexe. Vale ressaltar que o controle não havia alterações histopatológicas dignas de nota.



**Figura 28 (A-D):** Secções histológicas de fígado de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 7 dias pós-infecção: (A) Área de necroapoptose dos hepatócitos; (B) Congestão dos sinusóides (setas pretas) e corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (seta vermelha); (C) Corpúsculo de Councilman Rocha-Lima (setas pretas); (D) Infiltrado inflamatório peri-portal (seta preta). Figura A em 20x e figuras A-D em 40x.

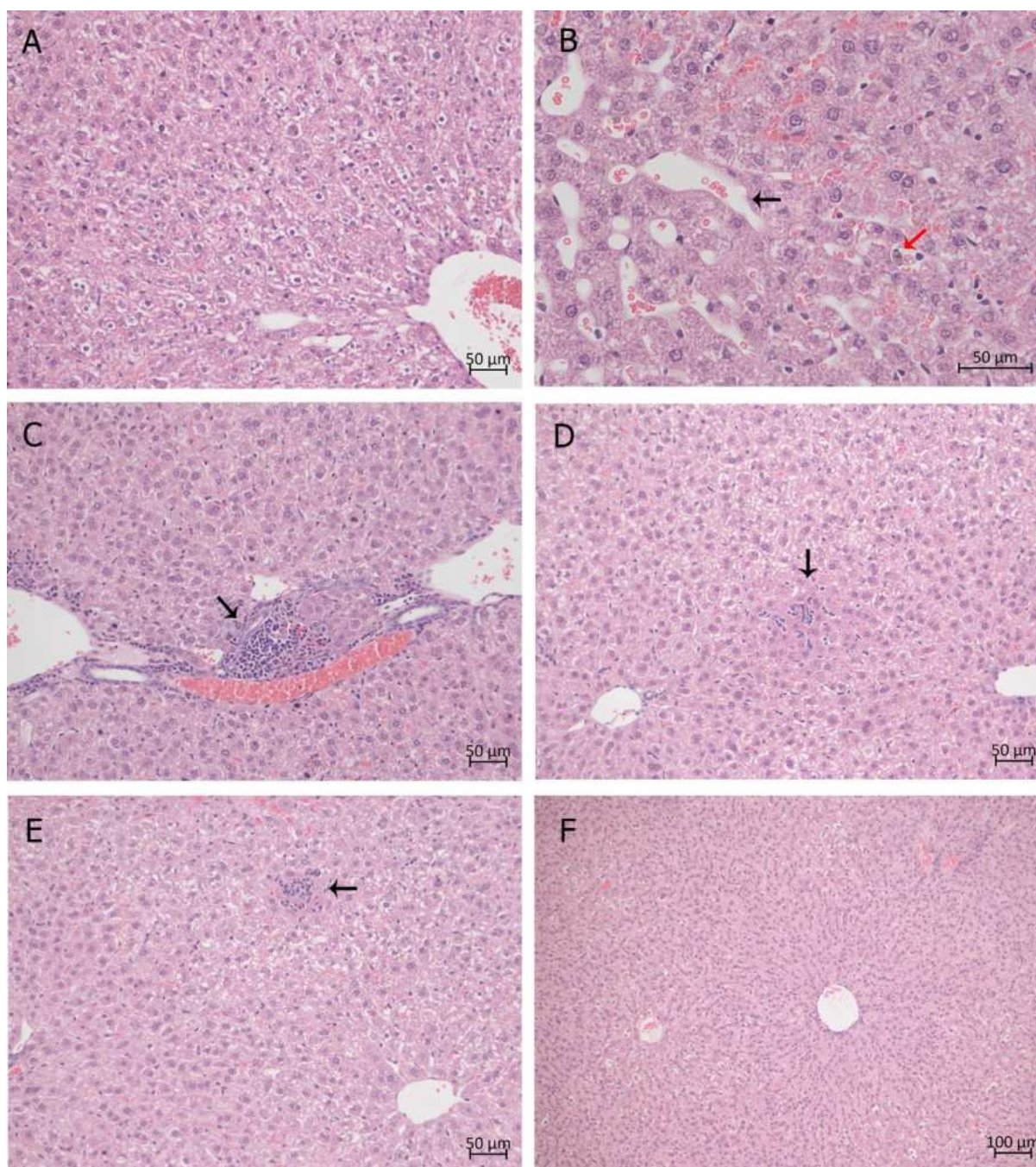
Com o avanço da infecção, em 9 dpi, alguns achados histopatológicos perpetuaram, como esteatose acentuada, área de congestão dos sinusóides, células aberrantes binucleadas, além da rara presença de corpúsculos acidofílicos, de hepatócitos em apoptose e de infiltrados inflamatórios peri-portal (Figura 29 A-C). Apesar destes achados histopatológicos ainda estarem presentes, neste estágio de infecção, iniciaram-se os achados de tentativa de regeneração, como frequente presença de hepatócitos em mitose, início da reorganização do tecido em cordões hepáticos e a presença de infiltrados inflamatórios em zona intermediária em torno de restos celulares (Figura 29 D-F). Diferentes dos animais infectados, o fígado do animal controle não apresentou alterações histopatológicas dignas de nota.



**Figura 29 (A-F):** Secções histológicas de fígado de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 9 dias pós-infecção: (A) Área de desorganização dos hepatócitos e célula em morte celular em estágio de cariorrexe (círculo); (B) Célula aberrante (seta preta); (C) Intenso infiltrado inflamatório peri-portal (seta preta); (D) Infiltrado inflamatório ao redor de corpos apoptóticos (seta preta); (E) Célula em mitose em estágio de metáfase (seta preta) e corpúsculos de Councilman Rocha-Lima (seta branca); (F) Célula em mitose em estágio de anáfase (seta preta). Figuras A-F em 40x.

No último tempo de análise, em 14 dpi, os achados característicos de infecção aguda não foram mais observados, e permaneceram os achados de regeneração tecidual, como pequenos infiltrado inflamatório peri-portal, infiltrado inflamatório em zona intermediária em

torno de restos celulares, e neste estágio, o tecido hepático destes animais já se revelavam organizados, perto da regeneração total (Figura 30 A). Com exceção de um único animal, que também foi positivo para a detecção do material genético viral no fígado, no qual observou-se infiltrados inflamatórios peri-portais mais proeminentes, congestão dos sinusóides e apoptose de hepatócitos (Figura 30 B-E).

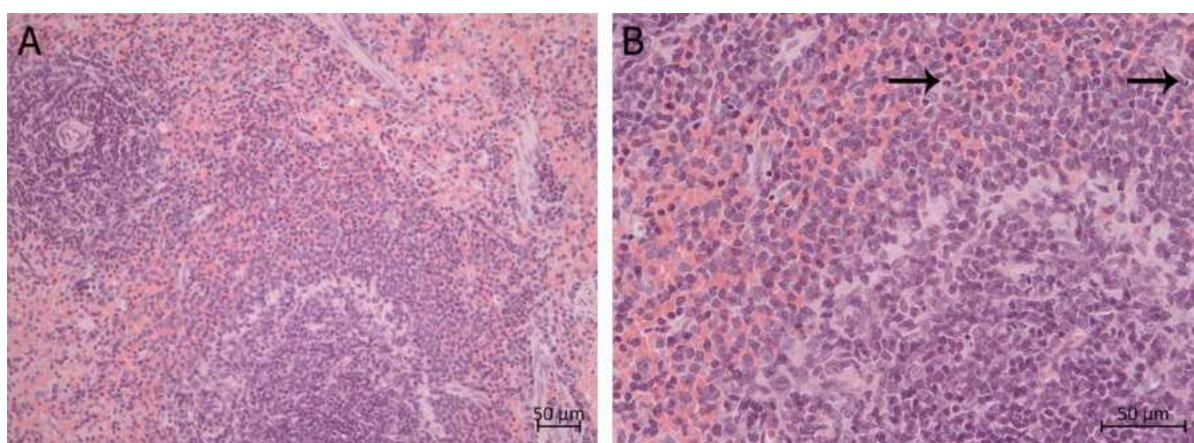


**Figura 30 (A-E):** Secções histológicas de fígado de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 14 dias pós-infecção: (A) Microesteatose acentuada; (B) Congestão dos sinusóides (seta preta) e apoptose de hepatócitos (seta vermelha); (C) Infiltrado inflamatório peri-portal (seta preta); (D) Infiltrado inflamatório em zona

intermediária (seta preta); (E) Infiltrado em torno de restos celulares (seta preta) e microesteatose ; (E) Ausência de alterações histológicas no animal controle. Figura A em 20x, figura B em 40x, figuras C-E em 20x e figura (F) em 10x.

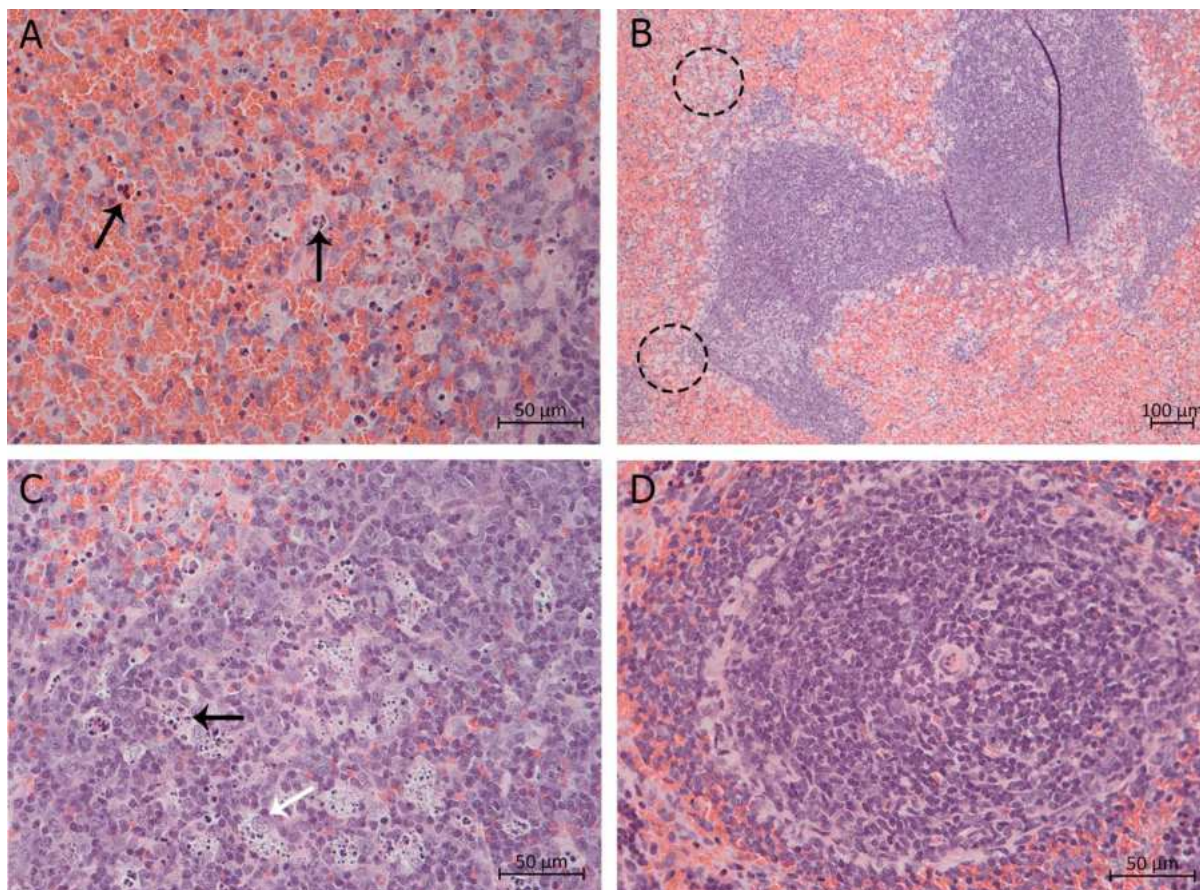
### 5.3.2. BAÇO

A análise histopatológica do baço em 2 dpi revelou hiperplasia da zona marginal (Figura 31 A) e o aparecimento de células polimorfonucleares (do tipo neutrófilos) (Figura 31 B).



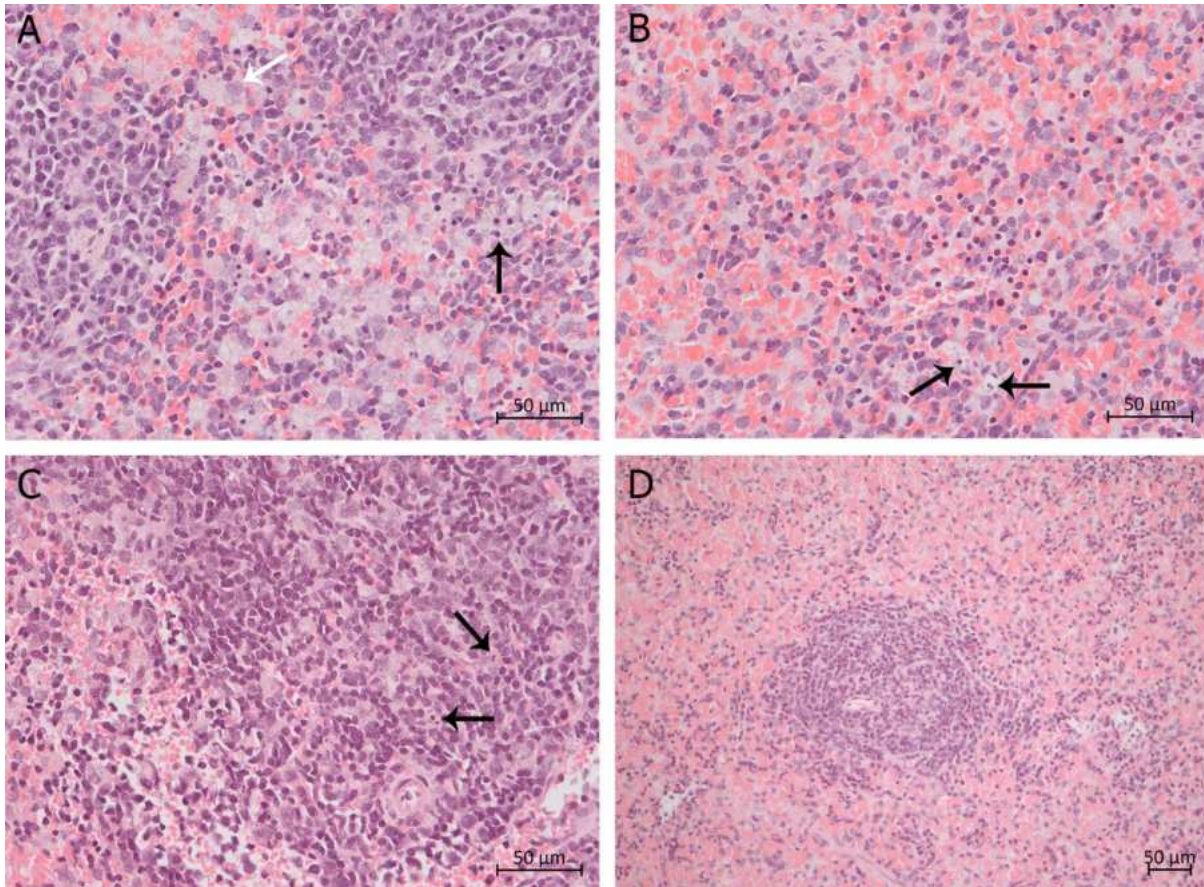
**Figura 31 (A-B):** Secções histológicas de baço de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 2 dias pós-infecção: (A) Hiperplasia da zona marginal da polpa branca; (B) Presença de neutrófilos na zona marginal. Figura (A) em 20x e figura (B) em 40x.

Em contraste, áreas de apoptose, desorganização e apoptose de polpa branca e desaparecimento da zona marginal, juntamente com o aparecimento de macrófagos ativados foram observados em 5 dpi (Figura 32 B-C). Ademais, estes animais apresentaram hiperplasia e apoptose na polpa vermelha (Figura 32 A). Por outro lado, o animal controle apresentava uma organização tecidual da polpa branca, ausência de áreas de morte celular e zona marginal bem delimitada (Figura 32 D)



**Figura 32 (A-D):** Secções histológicas de baço de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 5 dias pós-infecção: (A) Células em apoptose na polpa vermelha (setas pretas); (B) Desorganização da polpa branca e presença de macrófagos ativados ao redor do folículo (círculo); (C) Área de morte celular apoptótica de linfócitos na polpa branca (seta preta) e fagocitose de restos celulares por macrófago ativado (seta branca); (D) Controle com folículo linfoide organizado e zona marginal bem delimitada. Figuras A-C-D em 40x e figura B em 10x.

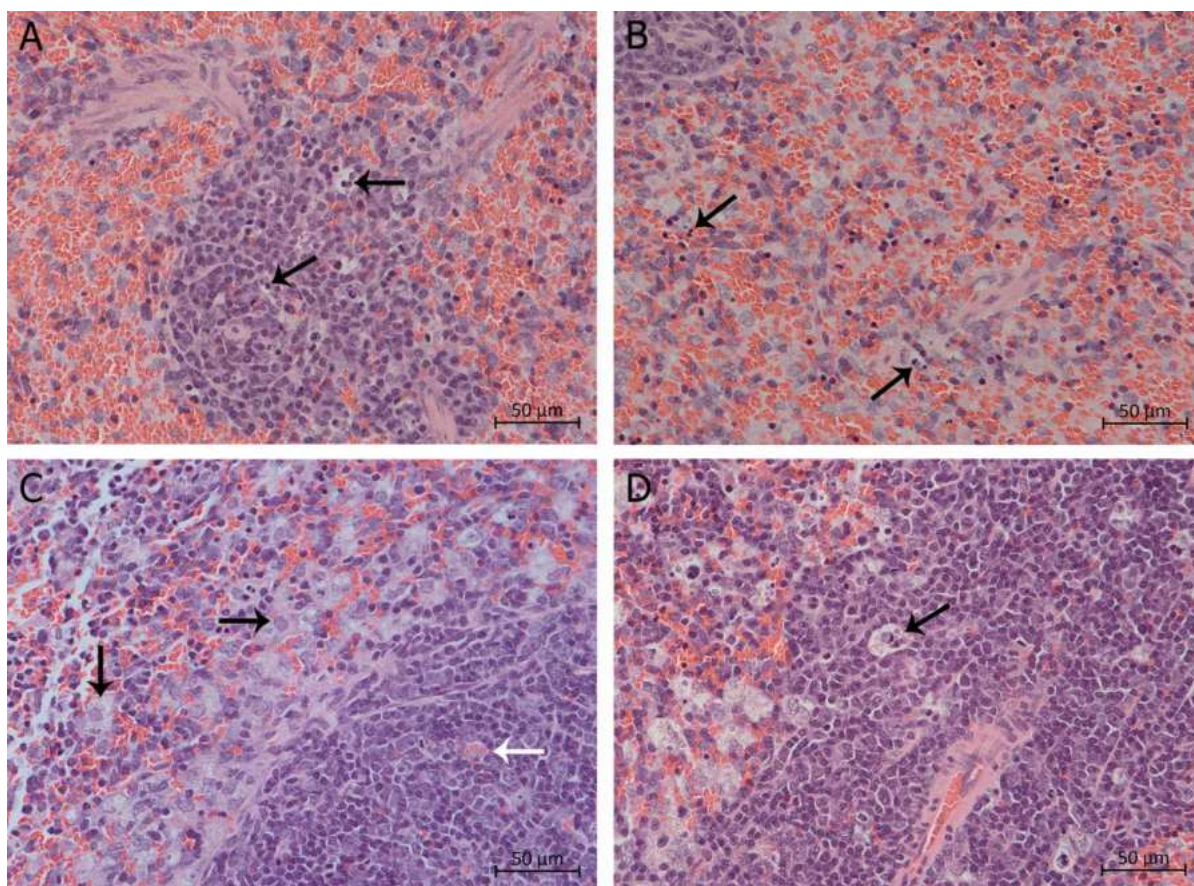
Ao decorrer na análise, em 6 dpi, hamsters sírios apresentaram tecido esplênico com atrofia de polpa branca, hipoplasia/perda da zona marginal do folículo (Figura 33 D), apoptose de células na polpa branca (Figura 33 C) e vermelha (Figura 33 B) e presença de macrófagos ativados (Figura 33 A).



**Figura 33 (A-D):** Secções histológicas de baço de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 6 dias pós-infecção: (A) Presença de macrófagos ativados (seta branca) e linfócitos em apoptose (seta preta); (B) Células em apoptose na polpa vermelha (setas pretas); (C) Presença de apoptose de linfócitos na polpa branca (setas pretas); (D) Atrofia e perda da zona marginal do folículo linfoide. Figura A-C em 40x e figura D em 20x.

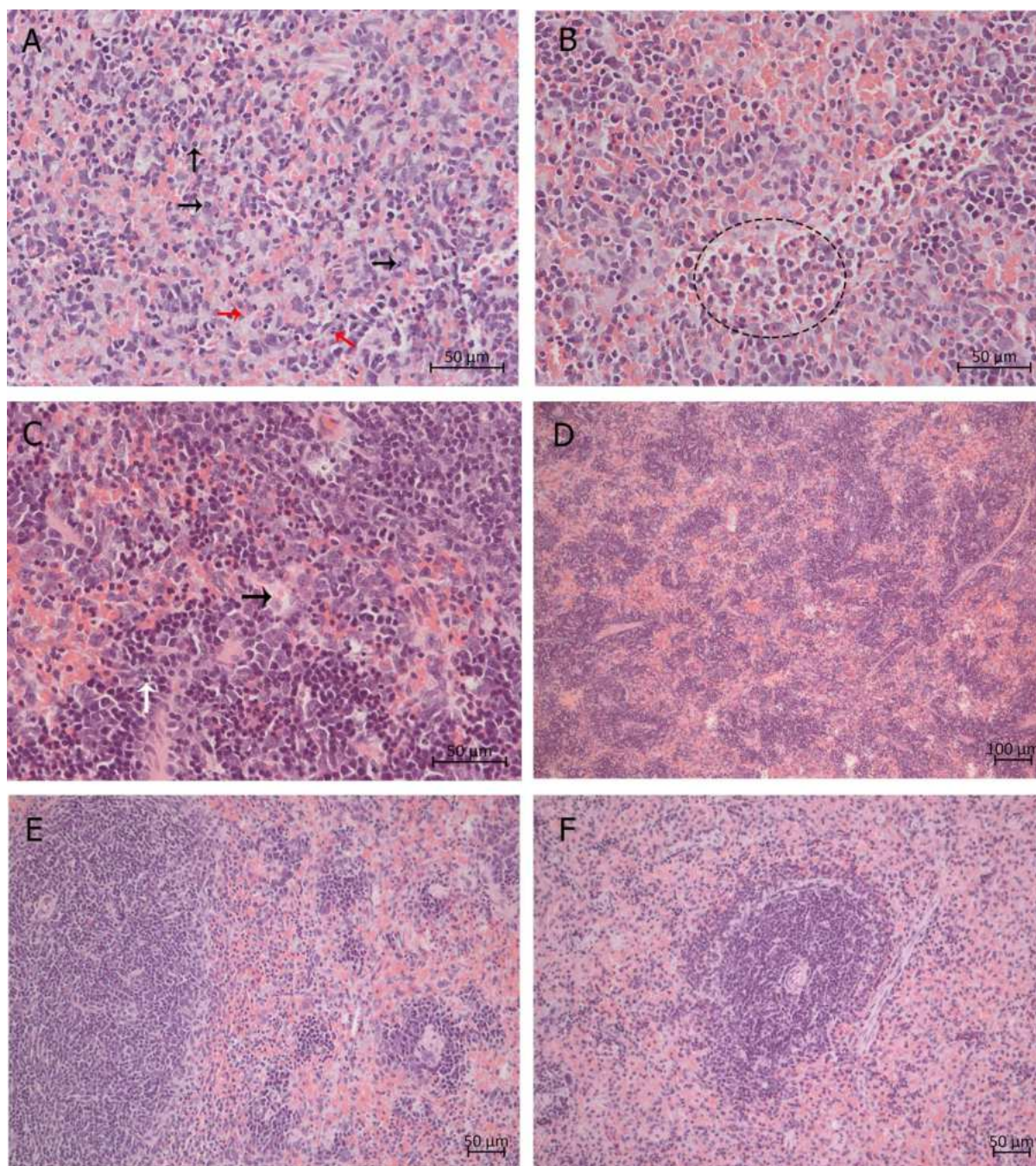
Em 7 dpi, os animais apresentaram uma resposta macrofágica mais exacerbada com predominância na zona marginal do folículo linfoide (Figura 34 C-D). Além disso, os baços apresentaram extensas áreas de apoptose (Figura 34 A-B), presença de eritrofagocitose (Figura 34 C) e leucofagocitose na zona marginal (Figura 34 D). Ademais, observou-se a perda da delimitação da polpa branca e atrofia do folículo linfoides (Figura 34 A), enquanto que o controle, por sua vez, não apresentou alterações histopatológicas significativas, com tamanho normal, ausência de macrófagos e de áreas de morte celular, organização tecidual e zona marginal bem delimitada.





**Figura 34 (A-D):** Seções histológicas de baço de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 7 dias pós-infecção: (A) Atrofia do folículo linfoide e morte celular apoptótica de células linfoides na polpa branca (setas pretas); (B) Morte celular apoptótica de células linfoides na polpa vermelha (setas pretas); (C) Presença de macrófagos ativados (setas pretas) e eritrofagocitose (seta branca); (D) Leucofagocitose (seta preta). Figura A-D em 40x.

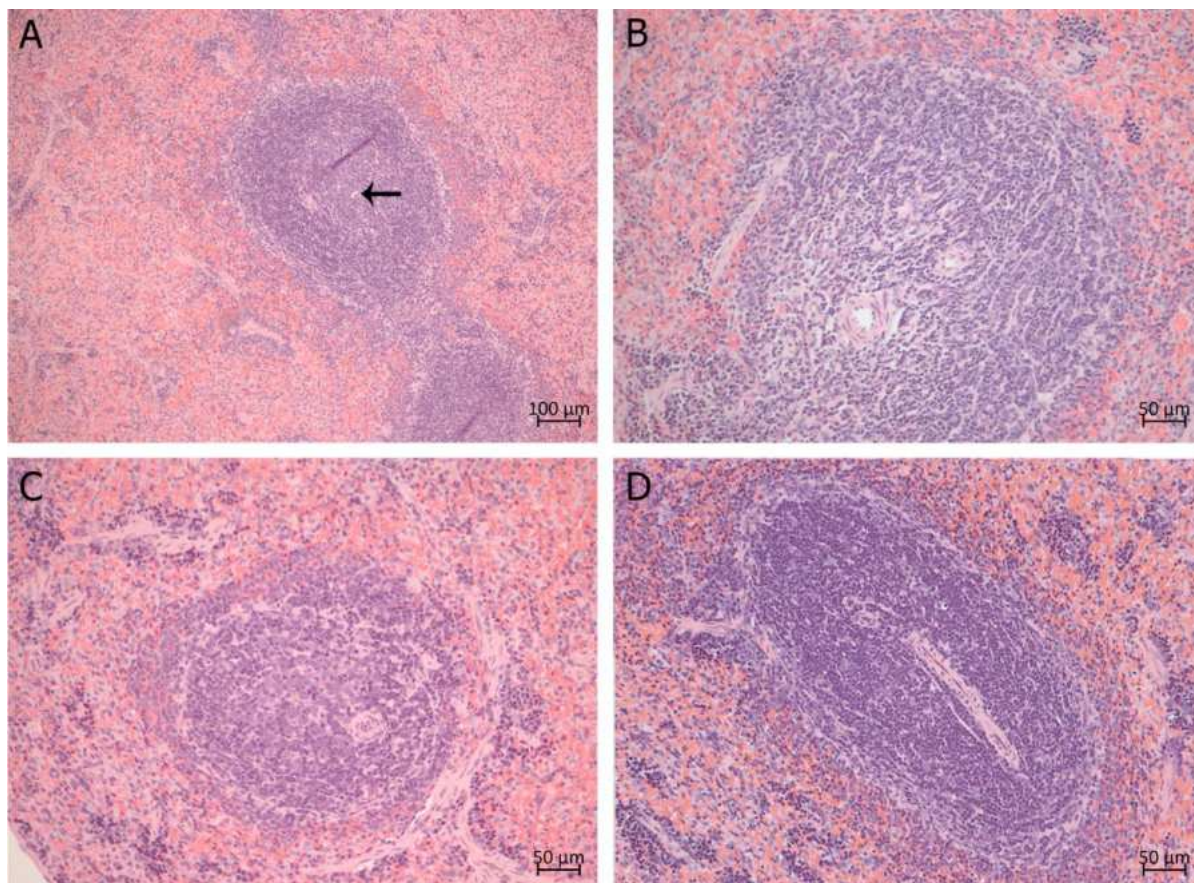
Seguidamente, nos tecidos analisados em 9 dpi, persistiram os achados de células em apoptose na polpa branca e vermelha (Figura 35 A e C), presença de macrófagos ativados (Figura 35 C), com adição de intensa neutrofilia (Figura 35 A), necrose (Figura 35 B) e desorganização da polpa branca (Figura 35 D) . No entanto, observaram-se achados do início de regeneração nestes animais, como presença de mitose e um processo de recomposição da zona marginal (Figura 35 E-F).



**Figura 35 (A-F): Secções histológicas de baço de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 9 dias pós-infecção:** (A) Morte celular apoptótica de células na polpa vermelha (seta vermelha) e presença de neutrófilos (seta preta); (B) Necrose em polpa em polpa vermelha (círculo) ; (C) Presenças de macrófagos ativados (seta preta) e morte celular por apoptose em polpa branca (seta branca); (D) Desorganização tecidual e perda de zona marginal do folículo linfoide; (E)Recomposição da zona marginal do folículo linfoide. (F) Baço controle com ausência de alterações histopatológicas com zona marginal bem definida. Figura A-C em 40x, figura D em 10x, figura E-F em 20x.

A análise realizada aos 14 dpi, revelou uma zona marginal totalmente definida e delimitada (Figura 36 C), e raríssimos pontos de apoptose em polpa branca (Figura 36 A), com

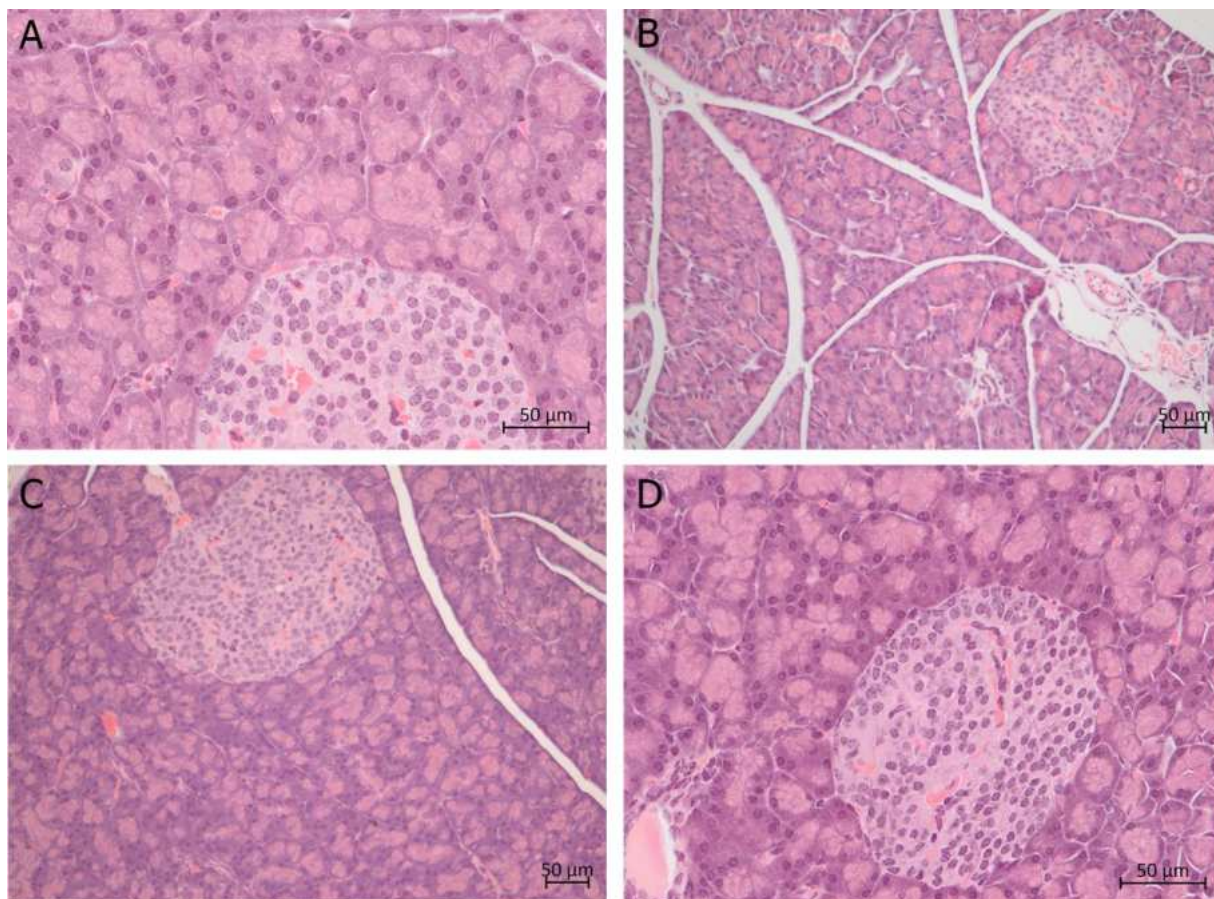
exceção de um animal em que apresentou a zona marginal menos desenvolvida com a presença de neutrófilos (Figura 36 C). O controle não apresentou alterações histopatológicas significativas (Figura 36 D)



**Figura 36 (A-D):** Secções histológicas de baço de Hamster sírios infectados pela cepa PR4408 em 14 dias pós-infecção: (A) Apoptose de células linfoides na polpa branca (seta branca) e recomposição da celularidade da zona marginal do folículo linfoide; (B) Zona marginal do folículo linfoide em desenvolvimento; (C) Zona marginal bem desenvolvida; (D) Controle com folículo linfoide bem definido e zona marginal bem delimitada. Figura A em 10x e figura C-D em 20x.

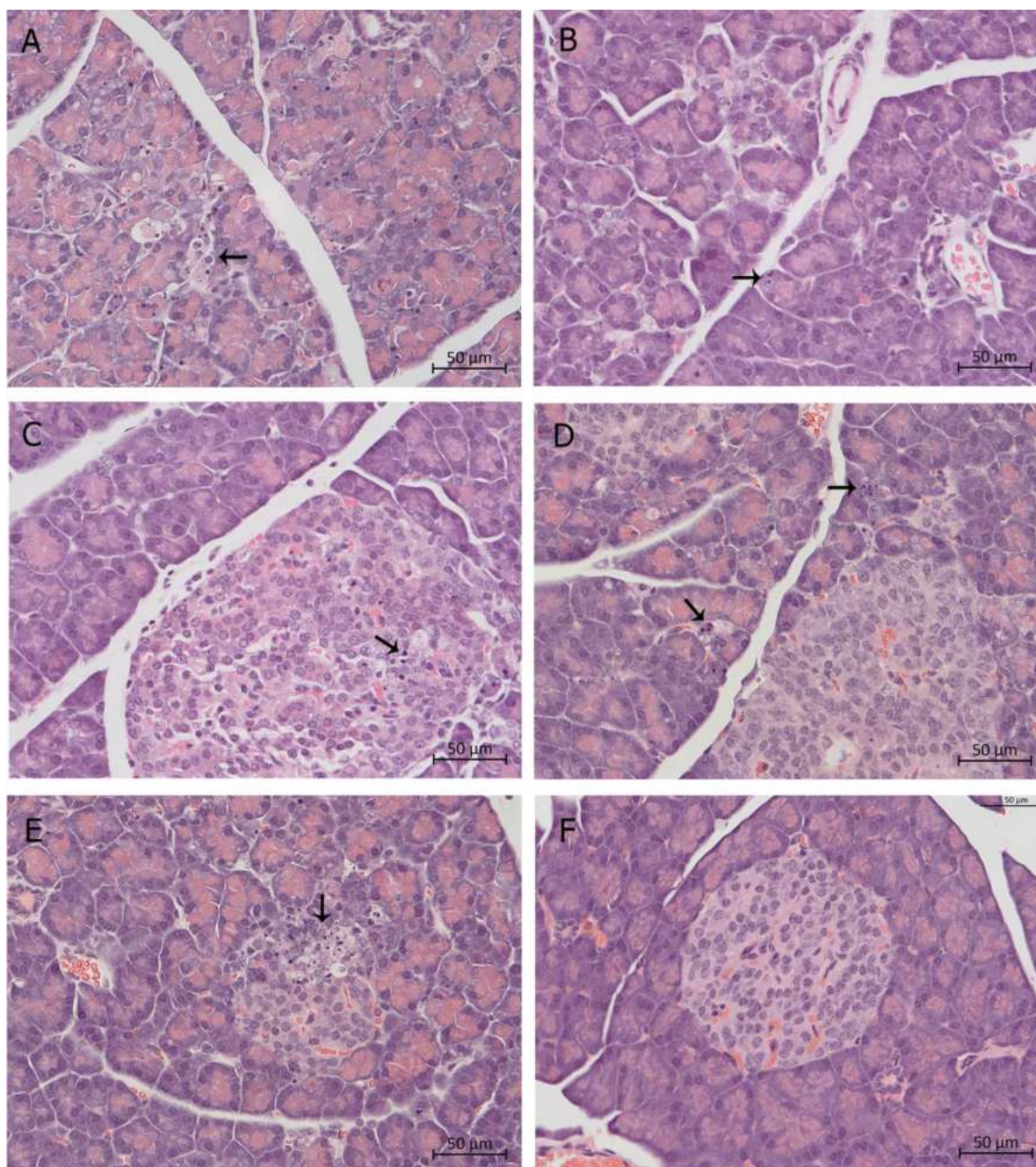
### 5.3.3. PÂNCREAS

Ao analisar o tecido pancreático dos animais infectados em 2 dpi, não foi possível observar nenhuma alteração histopatológica digna de nota, assim, como nos controles (Figura 37 A). Ademais, em 9 e 14 dpi, também não foram observados quaisquer achados histopatológicos no tecido dos animais (Figura 37 B-C). O tecido pancreático dos animais controles não apresentou nenhuma alteração histopatológica digna de nota (Figura 37 D)



**Figura 37 (A-D):** Secções histológicas de pâncreas de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 sem alterações histopatológicas em: (A) 2 dias pós-infecção; (B) 9 dias pós-infecção; (C) 14 dias pós-infecção; (D) Controle. Figura A e D em 40x e figura B-D em 20x.

Entretanto, em 5 dpi, já se iniciaram os achados de pontos de apoptose nos ácinos pancreáticos (Figura 38 A). Ao longo da infecção, em 6 e 7 dpi, além dos ácinos pancreáticos, observaram-se células em apoptose na ilhota pancreática (Figura 38 B-E). Entretanto, o controle se ausentava de células em morte celular e apresentava integridade tecidual dos ácinos pancreáticos e da ilhota pancreática (Figura 38 F).

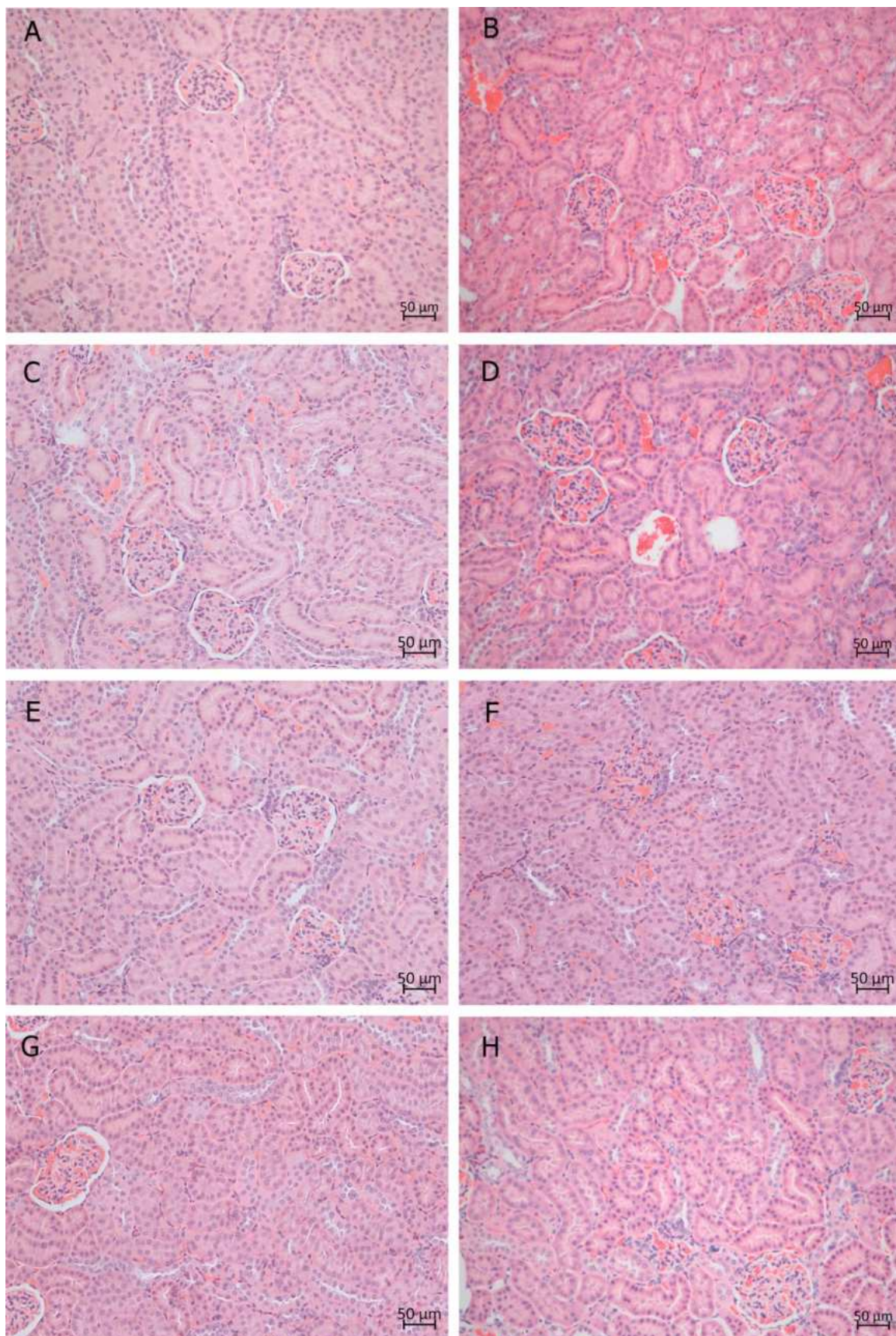


**Figura 38 (A-F):** Secções histológicas de pâncreas de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408: **(A)** Apoptose dos ácinos pancreáticos em 5 dias pós-infecção (seta preta) e **(B)** em 6 dias pós-infecção (seta preta); **(C)** Apoptose de células das Ilhotas de Langerhans em 6 dias pós-infecção (seta preta); **(D)** Apoptose dos ácinos pancreáticos em 7 dias pós-infecção (seta preta); **(E)** Apoptose de células das Ilhotas de Langerhans em 7 dias pós-infecção (seta preta); **(F)** Células dos ácinos pancreáticos e das Ilhotas de Langerhans sem alterações histológicas no controle. Figura A-F em 40x.

#### 5.3.4. RIM

A análise histopatológica dos rins dos animais infectados pela cepa PR4408 em todos os tempos analisados (2, 5, 6, 7, 9 e 14 dpi), não revelou quaisquer alterações histopatológicas

renais (Figura 39 A- F). O tecido apresentou um aspecto similar aos dos animais controles (Figura 39 G-H).



**Figura 39 (A-H): Secções histológicas de rim de Hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 sem alterações histopatológicas em: (A) 2 dias pós-infecção; (B) 5 dias pós-infecção; (C) 6 dias pós-infecção; (D) 7 dias pós-infecção; (E) 9 dias pós-infecção; (F) 14 dias pós-infecção; (G-H) Controle. Figura A-H em 20x.**

**Quadro 7: Resumos dos parâmetros moleculares e histopatológicos da infecção experimental pela cepa PR4408 do vírus da Febre Amarela em hamster sírio.**

PR4408						
Parâmetros Moleculares						
DPI	2	5	6	7	9	14
RNA viral no fígado	3/3	2/3	2/3	3/3	3/4	1/4
Parâmetros Histopatológicos - Fígado						
DPI	2	5	6	7	9	14
Infiltrados inflamatórios peri-portais	3/3	3/3	2/3	2/3	4/4	3/4
Corpúsculos CRL	1/3	1/3	2/3	3/3	3/4	1/4
Células em apoptose	1/3	2/3	2/3	2/3	1/4	1/4
Áreas de microesteatose	-	-	2/3	1/3	2/4	-
Congestão de sinusóides	-	-	1/3	1/3	1/4	1/4
Células aberrantes	-	-	1/3	-	1/4	-
Necrose	-	-		2/3	2/4	-
Figuras de mitose	-	-	1/3	1/3	4/4	-
Infiltrado em zona intermediária	-	-		-	-	2/4
Parâmetros Histopatológicos - Baço						
DPI	2	5	6	7	9	14
Hiperplasia da zona marginal com presença de neutrófilos	3/3					1/4
Presença de neutrófilos na polpa vermelha	1/3					
Hipoplasia de zona marginal		1/3	3/3		1/4	
Perda da estrutura do folículo linfóide e desorganização da zona marginal da polpa branca		1/3		1/3		
Pontos de apoptose em polpa branca		2/3	2/3	3/3	2/4	1/4
Pontos de apoptose em polpa vermelha			1/3	2/3	1/4	
Reação macrofágica			3/3	3/3	1/4	
Células aberrantes			1/3			

Recuperação da celularidade da zona marginal, mas ainda sem total definição					1/4	1/4
Desorganização da polpa branca					2/4	
Figuras de mitose					1/4	
Neutrofilia					1/4	
Necrose					1/4	
Recuperação da celularidade da zona marginal, com total definição						2/4
Reestruturação da zona marginal					1/4	
Hiperplasia de polpa vermelha		1/3				
Eritrofagocitose				2/3		
Leucofagocitose				1/3		
<b>Parâmetros Histopatológicos - Pâncreas</b>						
<b>DPI</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>14</b>
Células em apoptose na porção endócrina	-	-	1/3	2/3	-	-
Células em apoptose na porção exócrina	-	1/3	1/3	3/3	-	-
<b>Parâmetros Histopatológicos - Rim</b>						
<b>DPI</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>14</b>
Alterações renais	-	-	-	-	-	-

Legenda: Os valores são referentes ao número de animais infectados pela cepa PR4408. Em 2, 5, 6 e 7 dias pós-infecção foram 3 animais infectados e 1 animal controle negativo, já em 9 e 14 dias pós-infecção foram 4 animais infectados e 1 animal controle negativo.

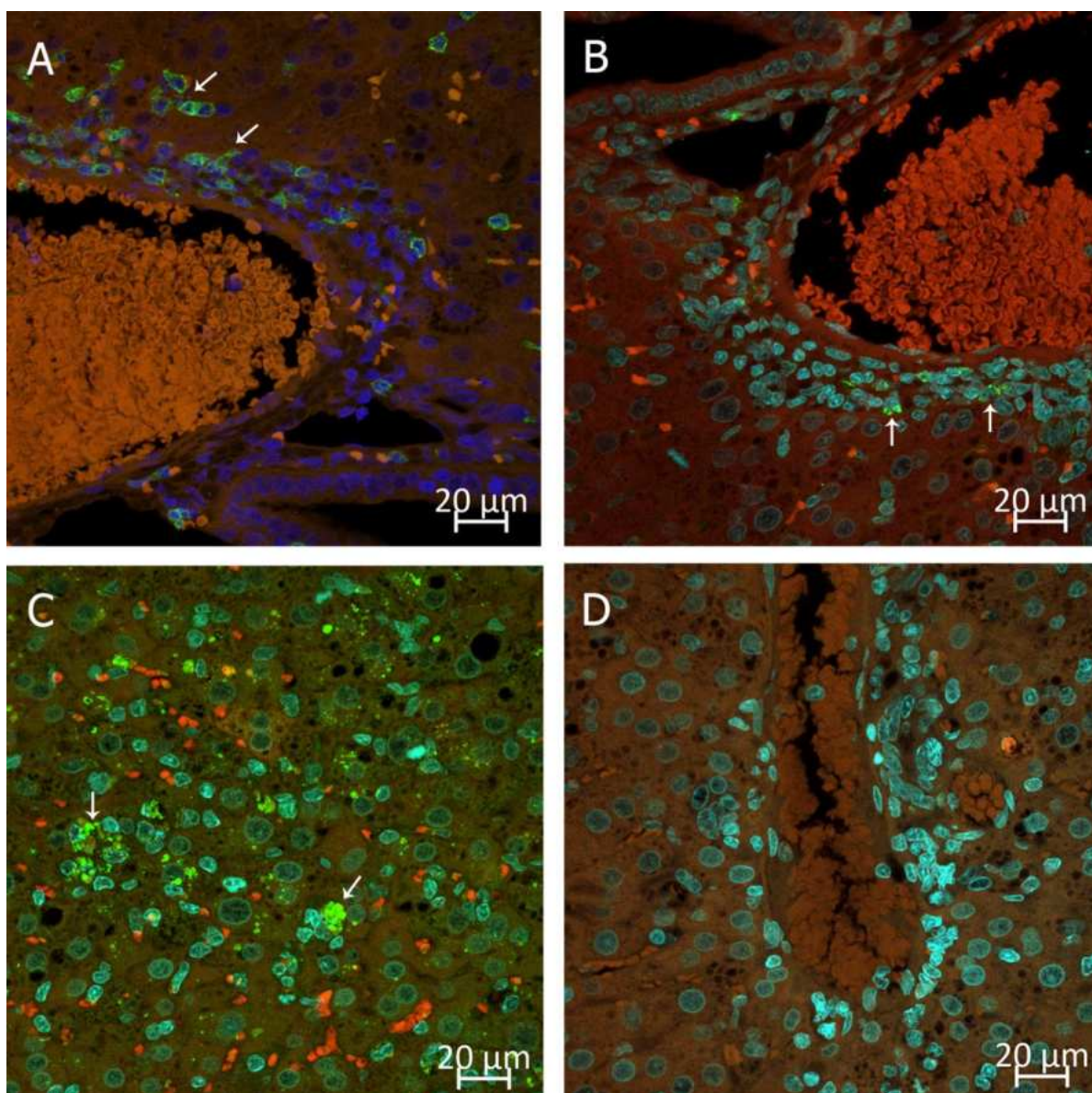
## 5.4. CARACTERIZAÇÃO POR IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

### 5.4.1. FÍGADO

Secções histológicas de fígados de hamsters sírios infectados aos 7 dpi foram imunomarcadas a fim de caracterizar as subpopulações de células presentes nos infiltrados inflamatórios peri-portais e quanto a presença do antígeno do vírus da febre amarela. A microscopia de fluorescência revelou a presença de linfócitos T (anticorpo anti-CD3) e linfócitos B (anticorpo anti-CD20) em infiltrados inflamatórios peri-portais, com maior prevalência de células T em detrimento das células B (Figura 40 A-B). Além disso, também foi possível detectar a presença do antígeno do vírus da febre amarela nos animais infectados



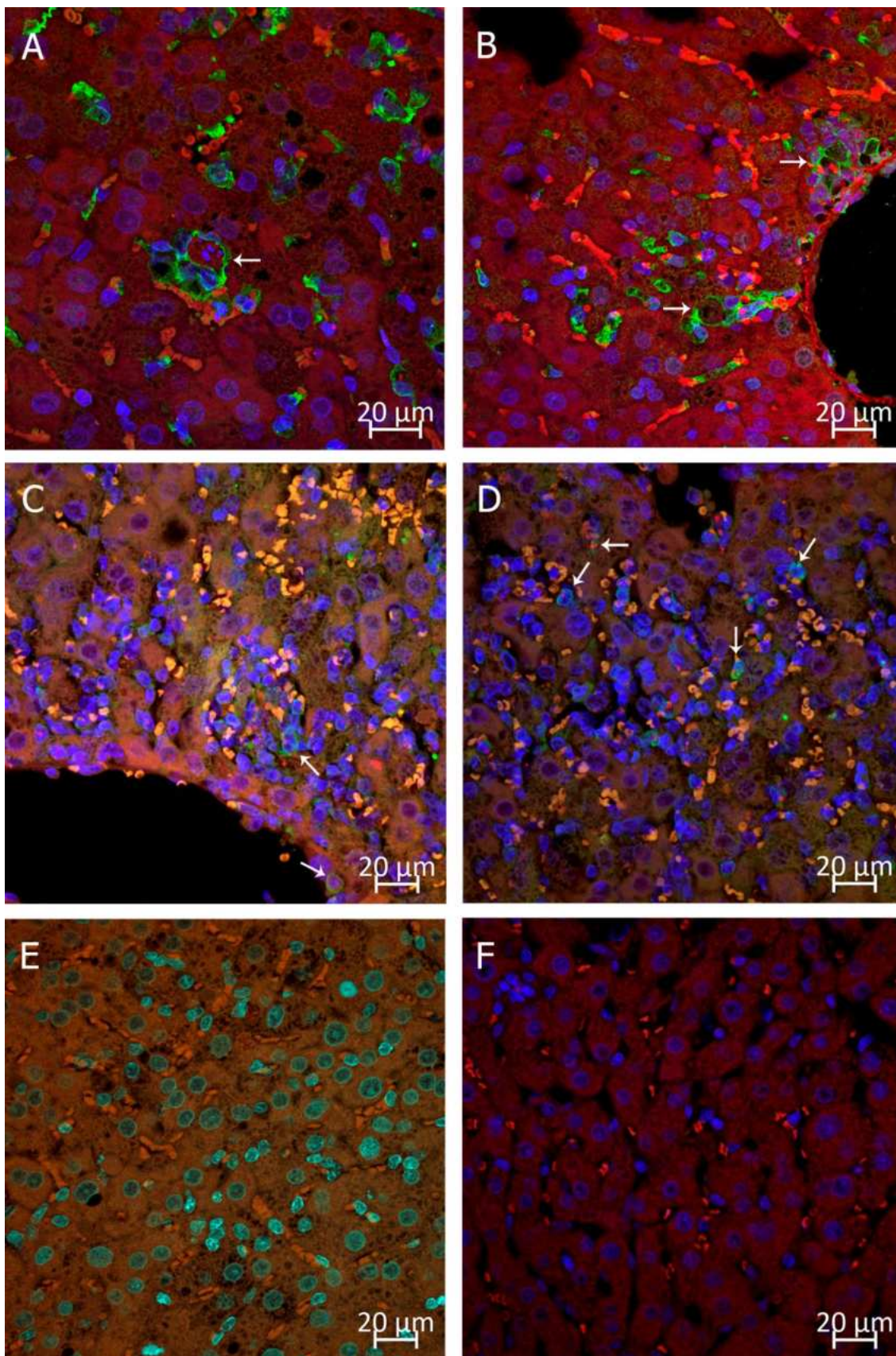
em área de lesão tecidual (Figura 40 C). Não foram observadas marcações inespecíficas no controle secundário (Figura 40 D).



**Figura 40 (A-D):** Secções histológicas de fígado de hamster sírio em 7 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela imunomarcados com: (A) anti-CD3 (linfócito T); (B) anti-CD20 (linfócito B); (C) anti-YFV (vírus da febre amarela); (D) Controle secundário anti-camundongo. Núcleo das células corado em azul (DAPI) e contra coloração do fundo em vermelho (Azul de Evans). Marcação dos antígenos com Alexa Fluor 488 na cor verde.

Além disso, a imunomarcação anti-IBA 1 no tecido hepático dos animais infectados em 7 dpi revelou a presença de macrófagos ativados, os quais estão realizando sua função fagocítica de células em apoptose (Figura 41 A), na qual através da marcação de DAPI, observamos a fragmentação nuclear dentro do compartimento fagocítico. Os macrófagos ativados também foram observados em infiltrados inflamatórios no espaço porta (Figura 41 B).

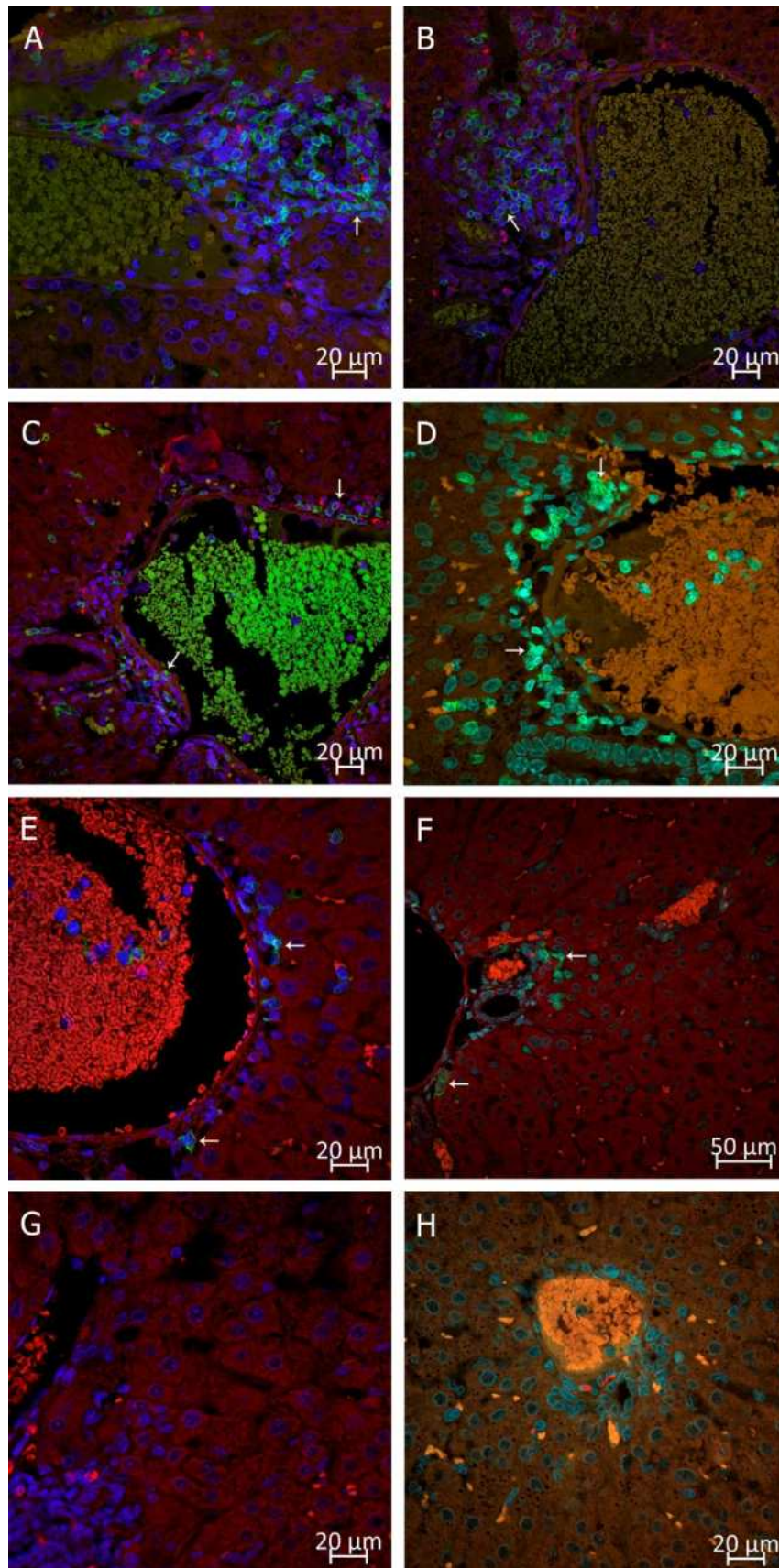
Ademais, a análise através da microscopia de fluorescência revelou que, nas lâminas marcadas com anti-caspase-3 ativada (via da apoptose), a marcação foi positiva para células do infiltrado inflamatório peri-portal (Figura 43 B) e também em algumas células presentes em área de lesão tecidual (Figura 41 D). Não foram observadas marcações inespecíficas nos controles secundários (Figura 41 E-F).



**Figura 41 (A-F):** Secções histológicas de fígado de hamsters sírios em 7 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela imunomarcados com: (A-B) anti-IBA 1 (macrófagos ativados); (C-D) anti-caspase 3 ativada (via da apoptose); (E) Controle secundário anti-coelho; (F) Controle secundário anti-

camundongo. Núcleo das células corado em azul (DAPI) e contra coloração do fundo em vermelho (Azul de Evans). Marcação dos antígenos com Alexa Fluor 488 na cor verde.

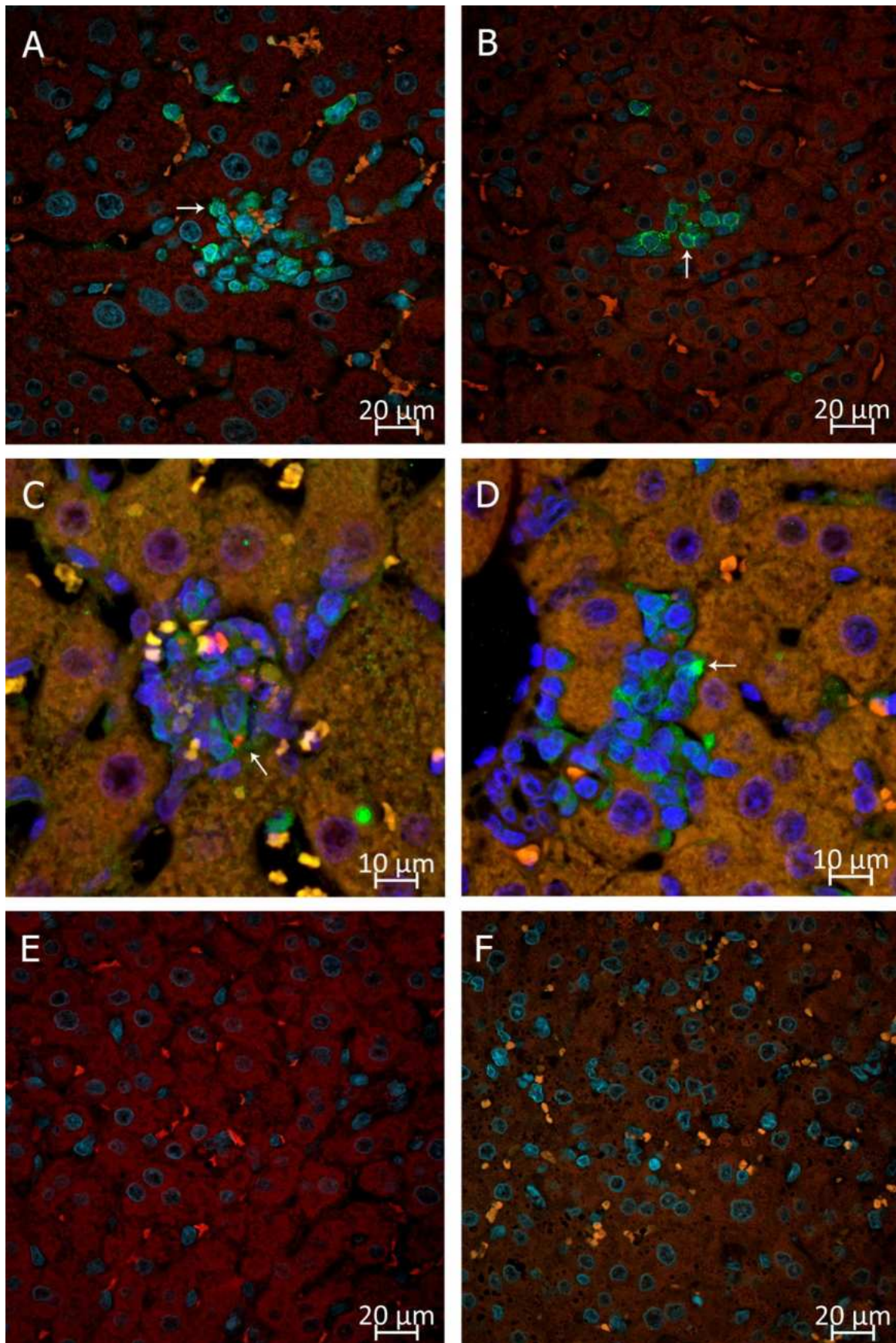
A fim de detectar o tipo celular predominante em infiltrados inflamatórios peri-portais, foram realizadas imunomarcações com o anticorpo anti-CD3, a fim de detectar a presença de subpopulações de células T em 5, 7 e 9 dpi. A partir da análise microscopia confocal, foi possível observar a presença de linfócitos T em todos os tempos analisados e além disso, pôde-se observar a predominância de células T em detrimento das demais células do infiltrado inflamatório não marcadas (Figura 42 A-F). Além disso, foi possível detectar este tipo celular dentro da veia central do fígado, indicando provavelmente este linfócito está migrando para o tecido hepático (Figura 42 D-E). O controle secundário anti-camundongo se ausentou de marcações inespecíficas (Figura 42 G-H).



**Figura 42 (A-H):** Secções histológicas de fígado de hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela imunomarcados com CD3 (linfócitos T) no espaço porta em: (A-B) 5 dias pós-infecção; (C-D) 7 dias pós-infecção; (E-F) 9 dias pós-infecção; (G-H) Controle Secundário anti-camundongo. Núcleo das células

corado em azul (DAPI) e contra coloração do fundo em vermelho (Azul de Evans). Marcação dos antígenos com Alexa Fluor 488 na cor verde.

Aos 9 dpi, também foi possível observar a presença de células T em infiltrado inflamatórios em zona intermediária (Figura 43 B) e, ao redor de restos celulares (Figura 43 A), como observado anteriormente na análise histopatológica. Paralelamente, foram realizadas imunomarcações com anticorpos anti-caspase-3 ativadas nos hamsters sírios infectados pela cepa PR4408 em 9 dpi, na qual os resultados desta análise revelaram a presença de caspase-3 ativada nestes infiltrados inflamatórios em zona intermediária em torno de restos celulares (Figura 43 C). A caspase-3 ativada também foi detectada nos infiltrados inflamatórios peri-portais destes animais analisados (Figura 43 D). Da mesma forma como os anteriores, os controles secundários anti-camundongos não apresentaram marcações inespecíficas (Figura 43 E-F).



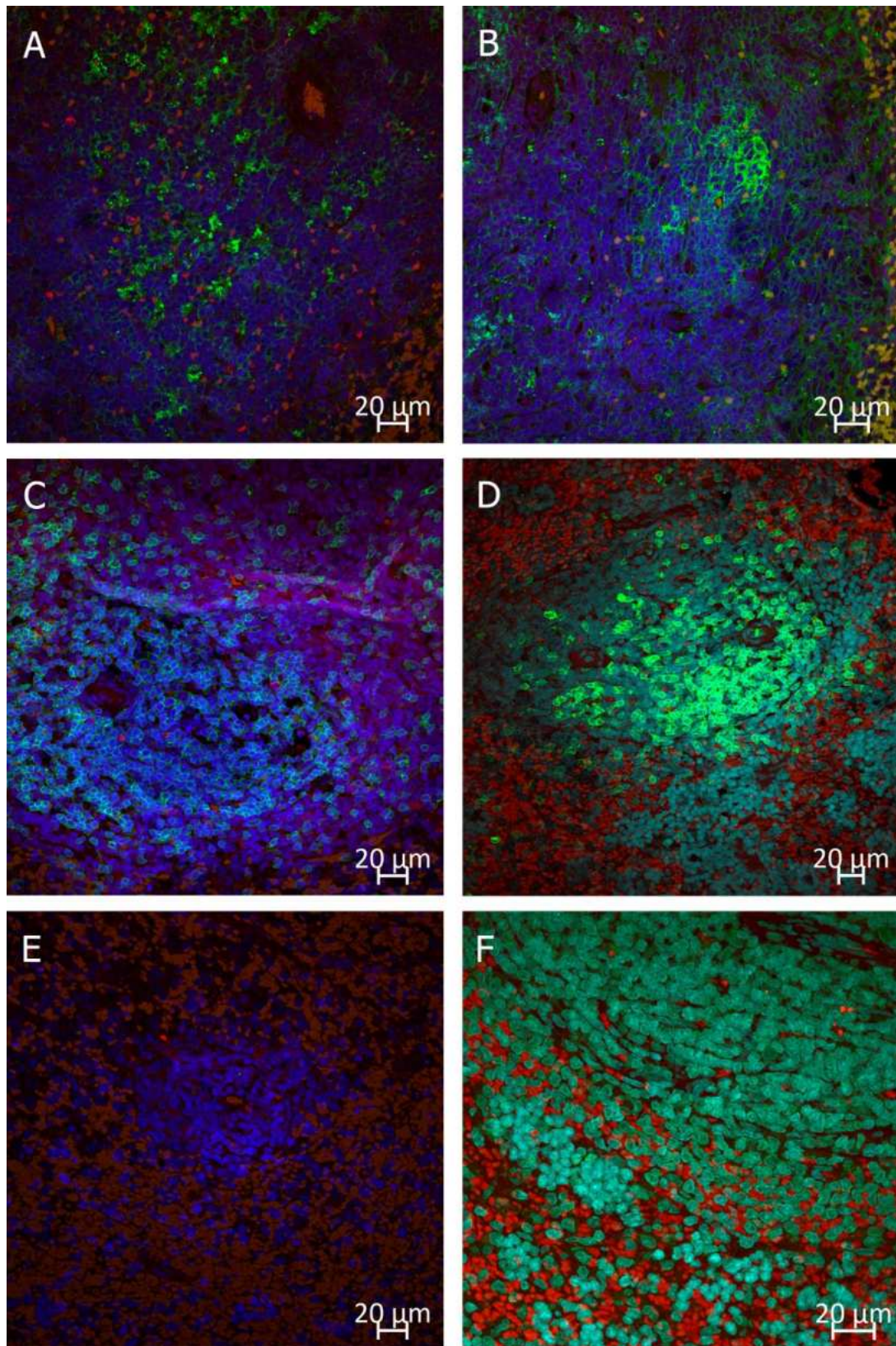
**Figura 43 (A-F):** Secções histológicas de fígado de hamsters sírios em 9 dias pós-infecção infectados pela cepa PR4408 do vírus da febre amarela imunomarcados com: (A-B) anti-CD3 (linfócitos T); (C-D) anti-caspase-3 ativada; (E-F) Controle Secundário anti-camundongo. Núcleo das células corado em azul (DAPI) e

contra coloração do fundo em vermelho (Azul de Evans). Marcação dos antígenos com Alexa Fluor 488 na cor verde.

#### **5.4.2. BAÇO**

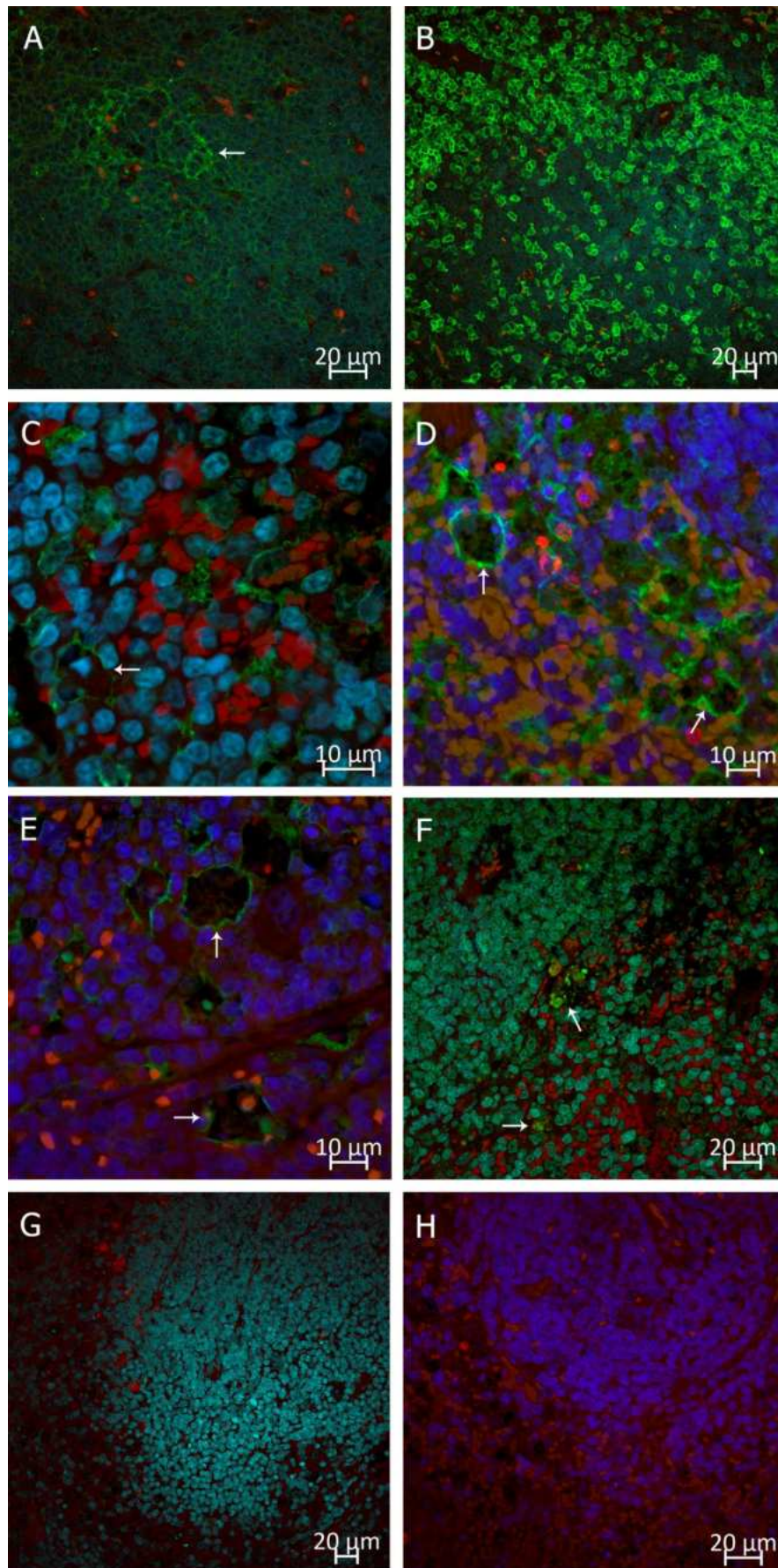
Micrografias de baço em 5 dpi foram imunomarcadas para a caracterização de subpopulações de células, evidenciando a presença de células B e células T dentro do folículo linfóide do baço. Entretanto, não foram observadas nenhuma diferença de prevalência entre linfócitos T e B nos animais infectados e nos animais controles. Além disso, não foram observadas diferenças de imunomarcações ao comparar os animais controles e infectados (Figura 44 A-D). Outrossim, como esperado, não foi possível detectar a presença do antígeno do vírus da febre amarela em animais controles (Figura 44 F). O controle secundário não apresentou marcações inespecíficas (Figura 44 E).





**Figura 44:** Secções histológicas de baço de hamster sírio imunomarcados com: (A-B) anti-CD20 (linfócitos B); (C-D) anti-CD3 (linfócitos T); (E) Controle Secundário; (F) anti-YFV (vírus da febre amarela); sendo A,C, E animais infectado 5 dias pós-infecção e B,D,F animais controles não infectados. Núcleo das células corado em azul (DAPI) e contra coloração do fundo em vermelho (Azul de Evans). Marcação dos antígenos com Alexa Fluor 488 na cor verde.

Os baços dos animais infectados em 7 dpi também foram caracterizados quanto a presença de células B e células T, presentes dentro do folículo linfoide. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença de prevalência entre estes tipos celulares (Figura 45 A-B). Além disso, foi possível detectar o antígeno do vírus da febre amarela no tecido esplênico na zona marginal do folículo linfoide, região a qual foi acometida com hipoplasia, como observado na análise histopatológica (Figura 45 F). Nestes animais, também foi possível realizar a marcação de macrófagos ativados ao redor do folículo linfoide como observados na análise histopatológica, através da imunomarcação com o anticorpo anti-IBA-1. Estes resultados revelam a ação destas células mononucleares no tecido esplênico, na qual estão realizando suas funções fagocíticas, como eritrofagocitose e leucofagocitose (Figura 45 C-D-E). Os controles secundários demonstraram-se ausentes de marcações inespecíficas (Figura 45 G-H).



**Figura 45:** Secções histológicas de baço de hamster sírios infectados em 7 dias pós-infecção pela cepa PR4408 imunomarcados com: (A) anti-CD20 (linfócitos B); (B) anti-CD3 (linfócitos T); (C-D-E) anti-IBA 1;

(F) anti-YFV (vírus da febre amarela); (G) Controle secundário anti-camundongo; (H) Controle secundário anti-coelho. Núcleo das células corado em azul (DAPI) e **contra coloração do fundo em vermelho (Azul de Evans)**. Marcação dos antígenos com Alexa Fluor 488 na cor verde.

## 6. DISCUSSÃO

A febre amarela é uma doença infecciosa de importância de saúde pública. Apesar de negligenciada, periodicamente ocorrem surtos tanto na África Subsaariana quanto na América do Sul (Vasconcelos, 2003; CDC, 2018). No Brasil, não há casos de febre amarela urbana desde 1942, mas existe um risco de reintrodução em centros urbanos povoados quando ocorrem surtos silvestres, devido à dificuldade de diagnósticos e devido a baixa cobertura vacinal (Shearer *et al.*, 2018). Além disso, a febre amarela, apesar de ser uma doença descoberta há muitos anos, ainda possui diversos aspectos desconhecidos sobre a sua patologia, em especial a histopatologia em que a maioria dos dados obtidos são de casos fatais humanos (Quaresma, 2013). Dessa maneira, existe uma necessidade de se estudar novos modelos animais imunocompetentes candidatos à infecção experimental, visto que os estudos de mecanismos de infecção pelo vírus da febre amarela são dificultados pela falta de modelos de pequeno porte apropriado a fim de substituir a utilização de PNHs (Miao *et al.*, 2019).

A ideia central de utilizar hamster sírios para infecção do vírus da febre amarela veio de estudos utilizando cepas selvagens de origem africana, nos quais demonstraram que através de passagens seriadas pelo macerado de fígado seguido de inoculação em outros animais, o vírus selvagem sofria mutações e se adaptava ao animal, levando a patologia grave da doença (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Sbrana *et al.*, 2001). Desta forma, seria possível utilizar um modelo imunocompetente que desenvolvesse patologia compatível com a febre amarela, no qual possui maiores vantagens e facilidades de utilização em estudos quando comparado aos PNHs (Julander, 2016; Shinde *et al.*, 2022).

Estudos recentes envolvendo a cepa PR4408 já demonstraram a alta virulência desta cepa com neurovirulência em camundongos BALB/c e alta taxa de infectividade em células de mamíferos (Furtado *et al.*, 2022). No atual estudo, mesmo ao serem infectados pela cepa selvagem PR4408, estes animais, que já foram descritos como resistentes a flavivirus, apresentaram patologia compatível com a doença e perda progressiva de peso (Laurent-Rolle *et al.*, 2014). É possível que estes resultados sejam em decorrência por suas mutações nas proteínas NS1 e NS3, que estão envolvidas em escape da resposta imunológica do hospedeiro, contudo mais estudos ainda são necessários para confirmar esta hipótese (Chen *et al.*, 2017;

Furtado *et al.*, 2022). Entretanto, este é o primeiro estudo a descrever as alterações histopatológicas em cepas circulantes no Brasil do vírus da febre amarela em modelo de roedor imunocompetente, sem a necessidade de adaptação (Tesh *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001).

Apesar da variabilidade do peso corporal, os resultados revelaram que a maioria dos animais começaram a perder peso do quarto para o quinto dia, tendo no sétimo dia a maior de perda, e voltam a ganhar massa corporal até os 14 dpi. Entretanto, alguns animais ainda perpetuam com a queda do peso. Igualmente, em 5 dpi iniciaram-se o agravamento dos achados histopatológicos, quando comparado aos 2 dpi, e aos 7 dias observou-se as alterações patológicas mais graves (Monath, 2001).

Inicialmente, foi realizada a RT-PCR para a detecção do vírus da febre amarela no fígado, para confirmar a infecção dos animais, pois este é o primeiro e o mais afetado órgão pela febre amarela (Monath, 2001).

Em 2 dpi, se iniciam os achados histopatológicos discretos, coincidindo com a detecção do vírus da febre amarela no fígado dos animais infectados. Em 5 e 14 dpi, os animais que não foram positivos na RT-PCR também não apresentaram nenhuma alteração histopatológica digna de nota, sugerindo que estes animais não se infectaram (Miao, *et al* 2019). Apesar de alguns animais não terem se infectado, assim como descrito na literatura, foi possível realizar a detecção do vírus da febre amarela no fígado em todos os tempos analisados (2, 5, 6, 7, 9 e 14 dpi) (Quaresma *et al.*, 2006a; Quaresma *et al.*, 2006b).

Na análise histopatológica, foram observados corpúsculos acidofílicos, infiltrados inflamatórios peri-portais, células em apoptose, esteatose, necrose, congestão dos sinusóides, como já relatados na literatura da patologia humana (Quaresma *et al.*, 2006a; Quaresma *et al.*, 2006b) Apesar de ter sido observado morte celular por necrose, a morte celular por apoptose foi predominante em nosso estudo através de achados de Corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, picnose e cariorrexe, assim como já relatados em casos fatais em humanos (Quaresma *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2007).

Aos 9 dpi no fígado, iniciaram-se os achados histopatológicos de regeneração como de mitose, infiltrados ao redor de restos celulares, o que ainda não se tem descrito em casos humanos e modelos animais. Isto se deve aos escassos dados de histopatologia de humanos disponíveis na literatura que são apenas de casos fatais e, ao fato de que os PNHs desenvolvem uma doença fulminante e de alta letalidade, indo a óbito em pouquíssimos dias (Hudson, 1928; Quaresma *et al.*, 2005). Aos 14 dpi, a maioria dos animais encontrava-se recuperado, com o ganho de peso corporal, ausência de RNA viral no fígado, diminuição das alterações

histopatológicas graves, o que demonstra que o hamster ao ser infectado por esta cepa selvagem possui a capacidade de recuperar da infecção.

Os infiltrados peri-portais observados na histologia foram caracterizados por imunomarcção através de imunofluorescência indireta em 5, 7 e 9 dpi. Aos 7 dpi, observou-se a prevalência de linfócitos T em detrimento de linfócitos B nos infiltrados inflamatórios do espaço porta, que já era esperado, pois é descrito na literatura o predomínio de linfócitos T no tecido hepático de casos fatais humanos (Quaresma *et al.*, 2006b; Quaresma *et al.*, 2013). Nos demais tempos, foi possível também observar a prevalência de células T quando comparado às demais células presentes nos infiltrados, ressaltando a importância de linfócitos T na fisiopatologia da febre amarela. Além disso, a imunomarcção de macrófagos ativados aos 7 dpi revelou o tipo M1 inflamatório (Wijesundera *et al.*, 2014), nos quais estavam realizando sua função fagocítica, como fagocitose de células em apoptose no fígado.

A imunomarcção de morte celular nos animais infectados 7 dpi por caspase-3 ativada se mostrou pouco acentuada e presente em células no infiltrado inflamatório ao invés de hepatócitos. Esse padrão de marcação foi oposto ao esperado, visto que em casos fatais humanos ocorre uma imunomarcção intensa por FAS e FAS-L, que também está relacionado com a predominância de células T e indicam um papel importante de mecanismos citotóxicos na indução dos hepatócitos via células TCD8+ (Quaresma *et al.*, 2006). Pretende-se realizar novamente esta marcação ao 5 dpi, no qual as células estão iniciando seus mecanismos de ativação de morte celular, ao contrário de 7 dpi, em que as células já se apresentam em apoptose, para confirmar nossos resultados.

Em 9 dpi, os infiltrados inflamatórios ao redor de restos celulares e em zona intermediária, foram caracterizados pela presença de células T e com presença de caspase-3 ativada. Estes linfócitos T possivelmente induziram os hepatócitos infectados pelo vírus à morte celular apoptótica via FAS/FAS-L, que culmina na ativação de caspases efetoras como caspase-3 ativada que ativamente leva a fragmentação nuclear e apoptose das células (Zhang, *et al* 2005)

O baço também é um dos órgãos mais afetados na infecção pelo vírus da febre amarela (Monath; Barrett, 2003; Hudson, 1928; Monath, 2001). Assim como no fígado, os achados iniciaram-se discretos em 2 dpi, foram se agravando em 5 e 7, mas aos 14 dias, todos os tecidos já se encontravam quase totalmente regenerados. Assim como já descrito na literatura em humanos, PNHs e hamster sírios, neste trabalho observamos a morte celular de polpa branca por meio de apoptose e também o aparecimento de macrófagos ativados esplênicos na zona

marginal e dentro do folículo linfóide (Xiao et al 2001; Klotz; Belt, 1930; Engelmann et al., 2014).

Além disso, observou-se em 2 dpi, o aumento da zona marginal e o aparecimento de células polimorfonucleares. Já aos 5 e 6 dias, foram observados o desaparecimento da zona marginal e o aparecimento de macrófagos ativados, relatados em humanos, PNHs e hamster sírios. Também foram observadas células em apoptose na polpa vermelha. Em 7 dpi, os achados persistiram com adição de eritrofagocitose e leucofagocitose, ressaltando a presença e atuação de macrófagos no tecido esplênico. Provavelmente, a eritrofagocitose por parte dos macrófagos ocorreu em decorrência do extravasamento de sangue de um possível dano vascular, que levou a fagocitose de hemácias. Assim como, a leucofagocitose é provavelmente a fagocitose de células infectadas pelo vírus (Minasyan, 2018).

Em 9 dpi apesar de intensa desorganização tecidual, necrose, presença de neutrófilos, observou-se a tentativa de regeneração do animal com a presença de mitoses e início da reestruturação da zona marginal. Já aos 14 dias, o baço dos animais estava quase totalmente recuperado, ainda com alguns pontos apoptóticos na polpa branca e reestruturando a zona marginal, entretanto, macrófagos e neutrófilos não foram mais observados. Apesar de a necrose germinativa do folículo linfóide já ter sido descrita anteriormente em hamster e PNH, os hamsters infectados com a cepa PR4408 do vírus da febre amarela apresentaram prevalência de morte celular por apoptose (Monath *et al.*, 1981; Xiao *et al.*, 2001; Quaresma *et al.*, 2006; Engelmann *et al.*, 2014). Existe uma escassez de estudos de fisiopatologia no baço, a fim de explicar como essa patologia ocorre.

O tecido esplênico também foi caracterizado por imunofluorescência indireta. Foi possível fazer a detecção do antígeno do vírus da febre amarela em região cometida do baço, como a zona marginal dos animais infectados em 7 dpi (Duarte-Neto *et al.*, 2019). Ademais, a imunomarcagem de linfócitos T e linfócitos B, foi positiva dentro do folículo linfóide. Entretanto, não foram observadas nenhuma diferença de prevalência desses dois tipos celulares entre e dentro os animais infectados e os animais controles. Além disso, a imunomarcagem de macrófagos ativados foi positiva na zona marginal, local acometido durante a infecção. A análise de microscopia de fluorescência reafirmou os achados da histopatologia, na qual estas células mononucleares estão no baço realizando suas funções fagocíticas de leucofagocitose e a eritrofagocitose. Dessa forma, é possível que os macrófagos estejam auxiliando na resolução da infecção pelo vírus da febre amarela.

Só foram observadas alterações histopatológicas no pâncreas em 5, 6 e 7 dpi, que foram os dias que revelaram as patologias mais graves. Diferentemente do que é descrito em humanos e PNHs, nos quais o pâncreas não costuma ser afetado (Hudson, 1928), os resultados deste estudo revelaram morte apoptótica dos ácinos pancreáticos e nas células das ilhotas pancreáticas. Este achado também difere dos estudos realizados com hamsters infectados com cepas de febre amarela africanas adaptadas, nos quais os animais apresentaram necrose no parênquima acinar (Xiao., *et al* 2001).

Em nenhum dos tempos analisados, foram observadas alterações histopatológicas nos rins dos animais infectados. Esperava-se encontrar necrose dos túbulos renais, como já relatado para humanos e modelos animais. Entretanto, mesmo no modelo de hamster sírio utilizando cepas africanas adaptadas, apesar da ocorrência de alterações histopatológicas como degeneração tubular, os resultados foram inconsistentes (Xiao et al., 2001; Ferreira et al., 2020; Monath; Barrett, 2003). Além disso, é importante considerar que apesar de os rins serem classicamente atingidos na infecção pelo vírus da febre amarela, os danos neste órgão são considerados secundários pois são decorrentes do dano microvascular (Monath, 2001).

Tanto a análise clínica, os dados moleculares quanto os achados histopatológicos apresentaram variação entre os hamster sírios infectados do mesmo grupo de dpi. Provavelmente, pois estes animais não são endogâmicos e isogênicos, assim como os hospedeiros naturais da febre amarela, dessa forma, é uma forma representativa de simular o hospedeiro da doença (Fritzsche et al., 2006). Entretanto, o número de animais utilizando neste estudo é baixo e pretende-se aumentar a fim de obter uma análise estatística que reforce e confirme os dados apresentados.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados deste trabalho ressaltam a capacidade da infecção e virulência de cepas do vírus da febre amarela circulantes no Brasil nos últimos anos, como a PR4408, em mamíferos, como o Hamster sírio. Dessa forma, reafirmam a necessidade de um monitoramento destes genótipos dentro no território brasileiro, a fim de evitar epidemias e epizootias. Além disso, o hamster sírio apresentou patologia compatível com a febre amarela, sendo capaz de se recuperar ao longo da infecção. Desta maneira, se revela um bom modelo de estudo da histopatologia da doença. Por fim, este é o primeiro estudo a demonstrar a infecção por cepas selvagens de febre amarela circulantes no Brasil em modelo de roedor imunocompetente, sem a necessidade de adaptação.



## 8. REFERÊNCIAS

- Abreu, FVSD; Ribeiro, IP; Ferreira-de-Brito, A.; Santos, AACD; Miranda, RMD; Bonelly, IDS; Neves, MSAS;
- ALMEIDA, Eliza Aguiar de. Epidemia de Febre Amarela no Estado do Rio de Janeiro entre 2017 e 2018: correlação entre padrão espacial dos casos e da cobertura vacinal. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Faculdade de Enfermagem, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <http://www.bdtd.uerj.br/handle/1/18311>. Acesso em: 15 de março de 2023.
- Anderson, H.A.; Maylock, C.A.; Williams, J.A.; Paweletz, C.P.; Shu, H.; Shacter, E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 87–91.
- Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:209-29.
- Barrett AD, Teuwen DE, abarrett AD, Poland G, Barrett A. Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol.* 2009;21:308–13.
- Beasley, D. W., McAuley, A. J., & Bente, D. A. (2015). Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral research*, 115, 48-70.
- Beck A, Guzman H, Li L, Ellis B, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeographic Reconstruction of African Yellow Fever Virus Isolates Indicates Recent Simultaneous Dispersal into East and West Africa. *PLoS neglected tropical diseases.* 2013;7(3):e1910.
- Bersot, MI; Santos, TPD; Gomes, MQ; e outros *Haemagogus leucocelaenus* e *Haemagogus janthinomys* são os principais vetores do principal surto de febre amarela no Brasil, 2016–2018. *Emerg. Os micróbios infectam.* 2019,8, 218–231.
- Bertoletti, Antonio, and Mala K. Maini. "Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection?." *Current opinion in immunology* 12.4 (2000): 403-408.
- BRASIL. Saúde Brasil 2019 : Uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização. In: Epidemiológica SdV, editor. Brasília2019. p. 305-30.
- Bryant, J.E.; Holmes, E.C.; Barrett, A.D.T. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 2007, 3, e75.
- Camicas, J.L.; Hervy, J.P.; et al. Recent advances in research regarding sylvatic yellow fever in West and Central Africa. *Bull. De L'institut Pasteur* 1982, 80, 315–330. Recuperado de: [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_5/b\\_fdi\\_04-05/03774.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/b_fdi_04-05/03774.pdf) (Acessado em 13 de maio de 2023).
- Centers for Disease Control and Prevention. Global Health | Yellow fever | CDC [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/globalhealth/newsroom/topics/yellowfever/index.html>. (Acesso em 13 de maio de 2023)
- Centers for Disease Control and Prevention. Vaccine Information Statement | Yellow Fever | VIS | CDC [Internet]. 2020 . Recuperado de: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/yf.html> (Acesso em 13 de maio 2023)
- Centers for Disease Control and Prevention. Yellow Fever Virus | Areas with Risk of Yellow Fever Virus Transmission in Africa | CDCa [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/africa.html>. (Acesso em 13 de maio de 2023)
- Centers for Disease Control and Prevention. Yellow Fever Virus | Areas with Risk of Yellow Fever Virus Transmission in South America | CDCb [Internet]. 2018. Recuperado de: [https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south\\_america.html](https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south_america.html). (Acesso em 13 de maio de 2023)

Centers for Disease Control and Prevention. CDC |Yellow Fever Home | Transmission [Internet]. 2023. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html> (Acesso em 1 de novembro de 2023)

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu Rev Microbiol*. Outubro de 1990;44(1):649– 88. (Acesso em 13 de maio 2023)

Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017 Oct 7;9(10):291.

Clements, A.N.; Harbach, R.E. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol*. 2017, 42, 208–222. (Acesso em 13 de maio 2023)

Vasconcelos, da Costa PF. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(2):275-93.

Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin TY, Schneller S, Zust R, Dong H, Thiel V, Sen GC, Fensterl V, Klimstra WB, Pierson TC, Buller RM, Gale M Jr, Shi PY, Diamond MS. 2010. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* 468:452–456.

De Brito T, Siqueira S, Santos R, Nassar E, Coimbra T, Alves V. Human fatal yellow fever: immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathology-Research and Practice*. 1992;188(1):177-81.

de Souza RP, Foster PG, Sallum MA, Coimbra TL, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*. 2010;82(1):175-85.

Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gomez MM, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Front Microbiol*. 2019;10:1079.

Duarte-Neto, A. N., Cunha, M. D. P., Marcilio, I., Song, A. T., de Martino, R. B., Ho, Y. L., ... & Alves, V. A. (2019). Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. *Histopathology*, 75(5), 638-648.

E-book | Guia de finalização humanitária aplicada a roedores utilizados em pesquisa | 10 de agosto de 2023. I. Silva, Klena Sarges Marrvaz da. II. Lima, Monique Ribeiro de. Recuperado de: <https://www.atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/guia-de-finalizacao-humanitaria-aplicada-a-roedores-utilizados-em-pesquisas>. (Acesso em: 20/11/2023)

Engelmann, F., Josset, L., Girke, T., Park, B., Barron, A., Dewane, J., ... & Messaoudi, I. (2014). Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(11), e3295.

Fernandez-Garcia M-D, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe*. 23 de abril de 2009;5(4):318–28.

Fernando P, Vasconcelos DC. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(2):275–93.

Ferreira, M. S., Júnior, P. S. B., Cerqueira, V. D., Rivero, G. R. C., Júnior, C. A. O., Castro, P. H. G., ... & Vasconcelos, P. F. D. C. (2020). Experimental yellow fever virus infection in the squirrel monkey (*Saimiri* spp.) I: Gross anatomical and histopathological findings in organs at necropsy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115.

Freeman, G.J.; Casasnovas, J.M.; Umetsu, D.T.; DeKruyff, R.H. TIM genes: A family of cell surface phosphatidylerine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev*. 2010, 235, 172–189.  
Frierson JG. The Yellow Fever Vaccine: A History. *YALE J Biol Med*. 2010;83:77–85.

Fritzsche, P., Neumann, K., Nasdal, K., & Gattermann, R. (2006). Differences in reproductive success between laboratory and wild-derived golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) as a consequence of inbreeding. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 220-226.

Furtado, N. D., Raphael, L. D. M., Ribeiro, I. P., de Mello, I. S., Fernandes, D. R., Gómez, M. M., ... & Bonaldo, M. C. (2022). Biological characterization of yellow fever viruses isolated from non-human primates in Brazil with distinct genomic landscapes. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 757084.

Gardner CL, Ryman KD. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med.* março de 2010;30(1):237–60.

GERMAIN, M.; CORNET, M.; MOUCHET, J.; MONATH, T. P.; HERVÉ, J. P.; SALAUM, J. J.; CORDELLIER, R.; SALUZZO, J. F.; CAMICAS, J. L.; HERVY, J. P.; ROBERT, V.; DEUBEL, V.; GONZALEZ, J. P.; DIGOUTTE, J. P. & DARWISH, D. O., 1982. Recent advances in research regarding sylvatic yellow fever in west and central Africa. *Bulletin de L'Institut Pasteur*, *80*: 315-330.

Germain, M.; Cornet, M.; Mouchet, J.; Monath, T.P.; Hervé, J.P.; Salaun, J.J.; Cordellier, R.; Saluzzo, J.F.; Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* Nature Publishing Group; dezembro de 2010;8(12):S7–16.

Haagen E, Theiler M. Studies of Yellow Fever Virus in Tissue Culture. *Exp Biol Med.* 1 de janeiro de 1932;29(4):435–6.

Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Med Sci.* 1987;84:2019–23.

Hall WC, Crowell TP., Watts DM, Barros VLR, Kruger H, Pinheiro F, Peters CJ: (1991): Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistological analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* *45*: 408–417.

Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL, Vasilakis N (2013) Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distribution of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infection, Genetics and Evolution* *19*:292– 311. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.008>

Haslwanter, D., Lasso, G., Wec, A. Z., Furtado, N. D., Raphael, L. M. S., Alexandra, L. T., ... & Chandran, K. (2022). Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies. *Cell host & microbe*, *30*(2), 248-259.

Heinz FX, Stiasny K (2012) Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* *30*: 4301-4306.

Hudson NP. The pathology of experimental yellow fever in the Macacus rhesus. I. Gross pathology, *Am J Pathol*, 1928, vol. 4 (pg. 395-407)

Hudson, N.P. Adrian Stokes and yellow fever research: A tribute. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1966, *60*, 170–174.

Javelle E, Gautret P, Raoult D. Towards the risk of yellow fever transmission in Europe. *Clinical Microbiology and Infection.* 2019;25(1):10-2.

Julander, J. G. (2016). Animal models of yellow fever and their application in clinical research. *Current opinion in virology*, *18*, 64-69.

Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* 2011;1(13):1–9.

Kaul RB, Evans MV, Murdock CC, Drake JM. Spatio-temporal spillover risk of yellow fever in Brazil. *Parasites & Vectors.* 2018;11(1):1-12.

Kitchener S. Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX®. *Vaccine.* 2 de junho de 2004;22(17– 18):2103–5.

- Klitting, R., Roth, L., Rey, F. A., & de Lamballerie, X. (2018). Molecular determinants of yellow fever virus pathogenicity in Syrian golden hamsters: one mutation away from virulence. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-18.
- Klotz O, Belt T. The Pathology of the Liver in Yellow Fiver. *The American journal of pathology*. 1930;6(6):663.
- Kobayashi, N.; Karisola, P.; Pena-Cruz, V.; Dorfman, D.M.; Jinushi, M.; Umetsu, S.E.; Butte, M.J.; Nagumo, H.; Chernova, I.; Zhu, B.; et al. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 2007, 27, 927–940.
- Kondratowicz, A.S.; Lennemann, N.J.; Sinn, P.L.; Davey, R.A.; Hunt, C.L.; Moller-Tank, S.; Meyerholz, D.K.; Rennert, P.; Mullins, R.F.; Brindley, M.; et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for zaire ebolavirus and lake victoria marburgvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 8426–8431.
- Kuadkitkan, A.; Wikan, N.; Fongsaran, C.; Smith, D.R. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating denv-2 entry into insect cells. *Virology* 2010, 406, 149–161.
- Lai, C.; Lemke, G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* 1991, 6, 691–704.
- Laurent-Rolle, M., Morrison, J., Rajsbaum, R., Macleod, J. M. L., Pisanelli, G., Pham, A., ... & García-Sastre, A. (2014). The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell host & microbe*, 16(3), 314-327.
- Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, de Lamballerie X, et al. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol*. 2011;11:234
- Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*. 2008 May;82(10):4731-41. doi: 10.1128/JVI.00002-08. Epub 2008 Mar 12. PMID: 18337583; PMCID: PMC2346727.
- Lindenbach B, Rice C, Thiel H, Chanock R, Lindenbach BD, Thiel HJ, et al. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. 2007.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61
- Liu J, Liu Y, Shan C, Nunes BT, Yun R, Haller SL, et al. Role of mutational reversions and fitness restoration in Zika virus spread to the Americas. *Nat Commun*. 2021;12(1):595.
- Lloyd W, Theiler M, Ricci N. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Fevereiro de 1936;29(5):481–529.
- Lown BA, Chen LH, Wilson ME, Sisson E, Gershman M, Yanni E, et al. Vaccine administration decision making: the case of yellow Fever vaccine. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(6):837-43.
- Lubick KJ, Robertson SJ, McNally KL, Freedman BA, Rasmussen AL, Taylor RT, Walts AD, Tsuruda S, Sakai M, Ishizuka M, Boer EF, Foster EC, Chiramel AI, Addison CB, Green R, Kastner DL, Katze MG, Holland SM, Forlino A, Freeman AF, Boehm M, Yoshii K, Best SM. 2015. Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 surface expression. *Cell Host Microbe* 18:61–74.
- Maljkovic Berry I, Eyase F, Pollett S, Konongoi SL, Joyce MG, Figueroa K, et al. Global Outbreaks and Origins of a Chikungunya Virus Variant Carrying Mutations Which May Increase Fitness for *Aedes aegypti*: Revelations from the 2016 Mandera, Kenya Outbreak. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100(5):1249-57.
- McArthur, M. A., Suderman, M. T., Mutebi, J. P., Xiao, S. Y., & Barrett, A. D. (2003). Molecular characterization of a hamster viscerotropic strain of yellow fever virus. *Journal of virology*, 77(2), 1462-1468.
- Meier, K. C., Gardner, C. L., Khoretonenko, M. V., Klimstra, W. B., & Ryman, K. D. (2009). A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000614.

- Miao, J., Chard, L. S., Wang, Z., & Wang, Y. (2019). Syrian hamster as an animal model for the study on infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 2329
- Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*. 2007 Mar 23;282(12):8873-82. doi: 10.1074/jbc.M609919200. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17276984.
- Minasyan H. Phagocytosis and oxycytosis: two arms of human innate immunity. *Immunol Res*. 2018 Apr;66(2):271-280. doi: 10.1007/s12026-018-8988-5. PMID: 29508205.
- Ministério da Saúde | Vacina da febre amarela é indicada em todo território nacional para as pessoas entre nove meses a 59 anos. Maio de 2022. Retirado de: <https://aps.saude.gov.br/noticia/17903>. (Acesso em: 21/11/2023)
- Miorin L, Laurent-Rolle M, Pisanelli G, Co PH, Albrecht RA, García-Sastre A, Morrison J. Host-Specific NS5 Ubiquitination Determines Yellow Fever Virus Tropism. *J Virol*. 2019 Jun 28;93(14):e00151-19. doi: 10.1128/JVI.00151-19. PMID: 31043530; PMCID: PMC6600188.
- Monath TP, Barrett AD. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Advances in virus research*. 2003;60:343-95.
- Monath TP, Cetron MS. Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics. *Clin Infect Dis*. Oxford University Press; 15 de maio de 2002;34(10):1369–78.
- Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 9 de agosto de 2005;4(4):553–74.
- Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2001;1(1):11-20.
- Monath TP: Treatment of yellow fever. *Antiviral Res* 2008, 78:116-124.
- Monath, T. P., and Pedro FC Vasconcelos. "Yellow fever." *Journal of clinical virology* 64 (2015): 160-173.
- Monath, T. P., Brinker, K. R., Chandler, F. W., Kemp, G. E., & Cropp, C. B. (1981). Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever with special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 30(2), 431-443.
- Monath, T. P., Seligman, S. J., Robertson, J. S., Guy, B., Hayes, E. B., Condit, R. C., ... & Brighton Collaboration Viral Vector Vaccines Safety Working Group. (2015). Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*, 33(1), 62-72.
- Monath, T.P.; Barrett, A.D.T. Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. In *Advances in Virus Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; Volume 60, pp. 343–395.
- Monath, T.P.; Brinker, K.R.; Cropp, C.B.; Chandler, F.W.; Kemp, G.E. Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever: With special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues\*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1981**, 30, 431–443.
- Monney, L.; Sabatos, C.A.; Gaglia, J.L.; Ryu, A.; Waldner, H.; Chernova, T.; Manning, S.; Greenfield, E.A.; Coyle, A.J.; Sobel, R.A.; et al. Th1-specific cell surface protein TIM-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002, 415, 536–541
- Moulin, J. C., Silvano, J., Barban, V., Riou, P., & Allain, C. (2013). Yellow fever vaccine: Comparison of the neurovirulence of new 17D-204 Stamaril™ seed lots and RK 168-73 strain. *Biologicals*, 41(4), 238-246.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; janeiro de 2005;3(1):13–22..
- Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8004-13. doi: 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005. PMID: 15956546; PMCID: PMC1143737.

National Library of Medicine | National Center for Biotechnology Information | Oas1b 2'-5' oligoadenylate synthetase 1B | [Internet] | 15-Jun-2023. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23961> (Acesso em 22/06/2023).

Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 125-142.

Norrby, E. Yellow fever and Max Theiler: The only Nobel Prize for a virus vaccine. *J. Exp. Med.* 2007, 204, 2779–2784.

BioFiocruz | Notícias e Artigos | O que sabemos sobre o surto de febre amarela no Brasil | 10 de Fevereiro de 2017 [Internet]. Recuperado de: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1399-o-que-sabemos-sobre-o-surto-de-febre-amarela-no-brasil>. (Acesso em: 20/11/2023)

OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde | Alerta Epidemiológico | Febre amarela | 31 de agosto de 2022. Pan American Health Organization | YellowFever | PAHO. 2015. Retirado de: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9476:yellowfever&Itemid=0&lang=en#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9476:yellowfever&Itemid=0&lang=en#gsc.tab=0). (Acesso em 13 de maio de 2023)

Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral research.* 2010;87(3).

Perelygin, A. A., Scherbik, S. V., Zhulin, I. B., Stockman, B. M., Li, Y., & Brinton, M. A. (2002). Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9322-9327.

Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses.* 2014;6:69–88.

Post PR, Carvalho R de, Freire M da S, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz;* agosto de 2001;96(6):849–57.

Postler TS, Beer M, Blitvich BJ, Bukh J, de Lamballerie X, Drexler JF, Imrie A, Kapoor A, Karganova GG, Lemey P, Lohmann V, Simmonds P, Smith DB, Stapleton JT, Kuhn JH. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Arch Virol.* 2023 Aug 10;168(9):224. doi: 10.1007/s00705-023-05835-1. PMID: 37561168.

Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature Reviews Immunology.* 2009;9(10):741-7.

Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade Jr HF, Vasconcelos PF, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2007;101(2):161-8.

Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NK cells activity. *Virology.* 2006;345(1):22-30. (b)

Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, Vasconcelos PFdC, et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus research.* 2006;116(1):91-7. (a)

Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta tropica.* 2005;94(2):116-27. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol.* Setembro de 2013;23(5):305–18.

Reed, W.; Carroll, J.; Agramonte, A.; Lazear, J.W. The etiology of yellow fever—A preliminary note. *Public Health Pap. Rep.* 1900,26, 37–53.

Reiter P. Climate Change and Mosquito-Borne Disease. *Environ Health Perspect.* 2001;142(1).

Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA.* 9 de outubro de 1996;276(14):1157–62

Rodhain F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* janeiro de 1991;14(1):9–19.

Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol.* 2006 May;80(9):4623-32. doi: 10.1128/JVI.80.9.4623-4632.2006. PMID: 16611922; PMCID: PMC1472005.

Ross MH WP. *Histologia – Atlas e Texto – em Correlação com Biologia Celular e Molecular* by GUANABARA KOOGAN - 7 o . Guanabara Koogan; 2016.

Rothlin, C.V.; Ghosh, S.; Zuniga, E.I.; Oldstone, M.B.; Lemke, G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007, 131, 1124–1136.

Rothlin, C.V.; Lemke, G. TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* 2010, 22, 740–746.

Rowland M, Plackett TP, Smith R. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Military Medicine.* 2012;177(4):467-9.

Sacchetto, L.; Silva, N.I.O.; Rezende, I.M.D.; Arruda, M.S.; Costa, T.A.; de Mello, E.M.; Oliveira, G.F.G.; Alves, P.A.; de Mendonca, V.E.; Stumpp, R.G.A.V.; et al. Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008658.

Sbrana, E., Xiao, S. Y., Popov, V. L., Newman, P. C., & Tesh, R. B. (2006). Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) III. Clinical laboratory values. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *74*(6), 1084-1089.

Shearer FM, Longbottom J, Browne AJ, Pigott DM, Brady OJ, Kraemer MU, et al. Existing and potential infection risk zones of yellow fever worldwide: a modelling analysis. *The Lancet Global Health.* 2018;6(3):e270-e8.

Shinde, D. P., Plante, J. A., Plante, K. S., & Weaver, S. C. (2022). Yellow Fever: Roles of Animal Models and Arthropod Vector Studies in Understanding Epidemic Emergence. *Microorganisms*, *10*(8), 1578.

Silva, N.I.O.; Sacchetto, L.; de Rezende, I.M.; Trindade, G.D.S.; LaBeaud, A.D. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Viol. J.* 2020, *17*, 9.

Simmonds, P.; Becher, P.; Bukh, J.; Gould, EA; Meyers, G.; Monath, T.; Muerhoff, S.; Pletnev, A.; Rico-Hesse, R.; Smith, DB; e outros Perfil da Taxonomia do Vírus ICTV: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2017,98, 2–3.

Simon LV, Hashmi MF, Torp KD. *Yellow Fever.* 2021.

Sironi M, Forni D, Clerici M, Cagliani R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004978.

Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 2011;3:160–71.

STOKES A, BAUER JH, HUDSON NP. THE TRANSMISSION OF YELLOW FEVER TO MACACUS RHESUS. *J Am Med Assoc.* 28 de janeiro de 1928;90(4):253.

Strode GK. *Yellow Fever.* London: McGraw-Hill Book Company, INC.; 1951.

- Tesh, R. B., Guzman, H., Da Rosa, A. P. T., Vasconcelos, P. F., Dias, L. B., Bunnell, J. E., ... & Xiao, S. Y. (2001). Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *The Journal of infectious diseases*, 183(10), 1431-1436.
- Theiler M. Studies on the Action of Yellow Fever Virus in Mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 8 de julho de 1930;24(2):249–72.
- To, K.K.; Yuen, K.-Y. In memory of Patrick Manson, founding father of tropical medicine and the discovery of vector-borne infections. *Emerg. Microbes Infect*. 2012, 1, 1–7.
- Transmission | Yellow Fever | CDC [Internet]. Janeiro de 2023. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/> (Acesso em 13 de maio de 2023)
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007;3(12):e201.
- Tuboi, S. H., Costa, Z. G. A., da Costa Vasconcelos, P. F., & Hatch, D. (2007). Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998–2002. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(2), 169-175.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006 Sep;87(Pt 9):2605-2614. doi: 10.1099/vir.0.81844-0. PMID: 16894199.
- Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *The Lancet*. 2001;358(9276):91-7.
- VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 275-293, 2003.
- Vieira WT, Gayotto LC, de Lima CP, de Brito T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. *Histopathology*. Março de 1983;7(2):195–208.
- Vieira WT, Gayotto LC, de Lima CP, de Brito T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. *Histopathology*. Março de 1983;7(2):195–208.
- WHO | Yellow fever – African Region [Internet] | 2023. Recuperado de: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON431> (Acesso em 13 de maio de 2023)
- WHO. Weekly epidemiological record. Vol. 88. 2013.
- Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Murakami H, Golbar HM, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol*. 2014 Jun;96(3):382-92. Epub 2014 Apr 18. PMID: 24747241.
- Willuweit, A., Sass, G., Schöneberg, A., Eisel, U., Tiegs, G., & Clauss, M. (2001). Chronic inflammation and protection from acute hepatitis in transgenic mice expressing TNF in endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 167(7), 3944-3952.
- Xiao, S. Y., Zhang, H., Guzman, H., & Tesh, R. B. (2001). Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *The Journal of infectious diseases*, 183(10), 1437-1444.
- Zhang S, He Y, Wu Z, Wang M, Jia R, Zhu D, Liu M, Zhao X, Yang Q, Wu Y, Zhang S, Huang J, Ou X, Gao Q, Sun D, Zhang L, Yu Y, Chen S e Cheng A (2023) Vias secretoras e múltiplas funções da proteína não estrutural 1 na infecção por flavivírus. *Frente. Immunol*. 14:1205002.
- Zhao Y, Soh TS, Lim SP, Chung KY, Swaminathan K, Vasudevan SG, Shi PY, Lescar J, Luo D. 2015. Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:14834–14839.