

KADIJA MOHAMED SANTEE

**Alterações gênicas de hepatócitos murinos infectados com vírus
da febre amarela**

São Paulo

2021

KADIJA MOHAMED SANTEE

Alterações gênicas de hepatócitos murinos infectados com vírus da febre amarela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4043
FMVZ

Santee, Kadija Mohamed
Alterações gênicas de hepatócitos murinos infectados com vírus da febre amarela /
Kadija Mohamed Santee. – 2021.
31 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto.

1. Doenças virais. 2. Febre amarela. 3. Hepatócitos. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ALTERAÇÕES GÊNICAS DE HEPATÓCITOS MURINOS INFECTADOS COM VÍRUS DA FEBRE AMARELA", protocolada sob o CEUA nº 5182220219 (ID 007696), sob a responsabilidade de **Rodrigo da Silva Nunes Barreto e equipe; Kadlja Mohamed Santee; Rafael Rodrigues Daniel** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 08/04/2020.

We certify that the proposal "GENIC CHANGES OF MURINE HEPATOCYTES INFECTED WITH YELLOW FEVER VIRUS", utilizing 3 Heterogenics mice (3 males), protocol number CEUA 5182220219 (ID 007696), under the responsibility of **Rodrigo da Silva Nunes Barreto and team; Kadlja Mohamed Santee; Rafael Rodrigues Daniel** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/08/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2020](#) a [02/2021](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [3 a 6 meses](#)

N: [3](#)

Linhagem: [C57bl/6](#)

Peso: [40 a 50 g](#)

Local do experimento: [Laboratório de Anatomia e laboratório de Cultivo Celular](#)

Comentário da CEUA: *Os estudo reúne condições de ser aprovado no âmbito desta CEUA*

São Paulo, 17 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTEE, Kadija Mohamed

Título: **Alterações gênicas de hepatócitos murinos infectados com vírus da febre amarela**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Derrel Homer Santee e Dorothy Schatzman Santee e para a minha mãe Debora May Santee por todo cuidado e apoio durante toda a minha graduação e pós-graduação. Sem vocês nada disso seria possível.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha vó Dorothy Schatzman Santee pelo apoio durante toda a minha vida de forma incondicional. *You lift me up.*

Ao meu avô Derrel Homer Santee e minha mãe Debora May Santee por todo o incentivo e auxílio no percorrer da minha graduação e pós-graduação.

À minha tia Rosilene Santee e meu tio Donald Santee pelo incentivo para iniciar a minha graduação, passo inicial para chegar na pós-graduação.

Aos meus professores da UFG de Catalão Zenon silva e Roseâmely Barros pelo incentivo na anatomia e acolhimento dentro da universidade e fora também.

Ao meu orientador Rodrigo Barreto por aceitar me orientar e me ajudou a crescer cientificamente e profissionalmente.

À Franceliusa Dellys que me recebeu em São Paulo desde o início, com todas as dicas de sobrevivência.

Ao Tarley Santos Oliveira e Thalles Duarte, pela amizade desde de as monitorias de anatomia à pós-graduação. Por me escutarem durante surtos de ansiedade, por rirem junto comigo e sofrerem também.

À Marcella Kato que me acolheu e foi minha primeira amizade no departamento, me auxiliou na pesquisa e foi um grande apoio nos momentos fundamentais.

Às minhas primas Lia Santee e Cynthia Santee pelo incentivo e força no decorrer dos anos.

Ao meu grupo de amigas em Caldas Novas Luciele, Thamirys, Aline e Lorryne por toda a preocupação e tentarem se fazer presentes mesmo distantes.

Ao Alan Puntschart por me proporcionar muitas alegrias e pela ajuda em me manter com o pé no chão nos momentos de ansiedade e tristeza e por ter sido o Sam para o meu Frodo.

À professora Ana Claudia Oliveira Carreira por todos os ensinamentos e dicas sobre cultivo celular.

Ao Igor Smirnow por todos os ensinamentos sobre histologia e auxiliar na reta final da atual pesquisa.

Aos demais colegas do PPGAADS Julia, Alice, Rafael, Juliana, Dara e Vitória pelo companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

"The ones who love us never really leave us; you can always find them in here."

Sirius Black

(Harry Potter - J. K. Rowling)



RESUMO

SANTEE, K. M. **Alterações gênicas de hepatócitos murinos infectados com vírus da febre amarela**. 2021. 31 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Sabe-se que o órgão mais afetado pela febre amarela é o fígado. Em estágios mais severos desta doença é possível identificar alterações histológicas, tal como a presença de pontos necróticos, esteatose hepática, formação de corpos apoptóticos e entre outros. Alguns estudos demonstram variações nas produções de citocinas mediadoras de inflamações como resultado da infecção aguda. Entretanto, a febre amarela pode se desenvolver sem apresentar sintomas de que há alterações ocorrendo nos órgãos afetados. Apesar disso, nossa hipótese é que o hepatócito do camundongo afetado com o vírus da febre amarela apresenta variações de expressão gênica desde a fase inicial da doença. Depois da infecção das células em cultura será realizado uma análise de qPCR nos hepatócitos e será observado modificações na expressão dos seguintes genes: pró (Tnf- α , Ip-10, Il-1 β e Il-8) e anti-inflamatórios (Tgf- β) e indicadores de apoptose (Casp3) em hepatócitos murinos AML2 após 72 e 144 horas de infecção *in vitro* pelo vírus da febre amarela. Nossos resultados demonstraram uma elevação de expressão gênica significativa após as 72 horas de inoculação nos genes Casp3, Il- β , Il-8, Tgf- β e Tnf- α . Enquanto o Ip-10 não demonstrou elevações significativas quando comparado ao grupo controle. Os resultados do grupo de 144 horas foram inconclusivos e estão em andamento, serão acrescentados ao trabalho posteriormente. Logo, com esse trabalho é possível afirmar que, existem variações gênicas presentes no fígado desde o início da infecção pelo vírus da febre amarela.

Palavras-chave: Doenças Virais. Febre Amarela. Hepatócitos.

ABSTRACT

SANTEE, K. M. **Genic changes of murine hepatocytes infected with yellow fever virus.** 2021. 31 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

It is known that one of the organs most affected by the yellow fever virus is the liver. In severe stages of the disease, macroscopic alterations are seen, such as the presence of necrotic points, hepatic steatosis, apoptotic body formation, and others. Some studies report variations in the production of pro and anti-inflammatory cytokines as a result of acute infection. However, yellow fever often develops as an asymptomatic infection, without evident clues that some alteration is occurring in the targeted organs. Thus, our hypothesis is that murine hepatocytes infected with the yellow fever virus present variation in the gene expression since early stages of infection. After the infection of culture cells, a qPCR analysis in the hepatocytes will be performed to analyze the expression of the pro (Tnf- α , Ip-10, Il-1 β e Il-8) and anti-inflammatory (Tgf- β) and indicators of apoptosis (Casp3) genes in murine hepatocytes AML12 after 72 and 144 hours of the infection with the yellow fever virus in vitro. Our results show a significant elevation of the gene expression after 72 hours of the virus inoculation in the genes: Casp3, Il- β , Il-8, Tgf- β e Tnf- α . While the Ip-10 did not express significant elevation when compared to the control group. The results of the 144 hours group were inconclusive and are in progress, which will be added to the work later. Therefore, with this research it is possible to affirm, there is genes variation present in the liver since the beginning of the infection by the yellow fever virus.

Keywords: Hepatocyte. Virus Diseases. Yellow Fever.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. FEBRE AMARELA	14
2.2. MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA.....	16
2.2.1. Acometimento hepático	16
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. HIPÓTESE	20
5. JUSTIFICATIVA.....	20
6. MATERIAIS E MÉTODOS	21
6.1. CULTIVO CELULAR	21
6.2. INFECÇÕES COM O VÍRUS DA FEBRE AMARELA	21
6.3. PCR QUANTITATIVO (qPCR)	21
7. RESULTADOS.....	23
8. DISCUSSÃO	24
9. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa causada pelo Vírus da Febre Amarela (VFA) que pertence ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. A transmissão da FA ocorre por meio da picada dos vetores contaminados, sendo eles o *Aedes* spp. comum na África e *Haemagogus* comum na América do Sul. Desde 1937, no Brasil se utiliza a vacina contra a FA associada a ações para combater o vetor da doença, sendo possível sua erradicação em áreas urbanas desde em 1942 (BRASIL, 2018). Cerca de 20 a 30% dos casos são considerados quadros leves a moderados e tem tratamento apenas paliativo dos sintomas, e não da doença em si (BRASIL, 2018). Por outro lado, cerca de 20 a 50% dos casos são severos, que levam a hemorragias, comprometimento de diversos sistemas e conseqüentemente a óbito (BRASIL, 2018; WHO, 2014). Atualmente, a estimativa anual global é que ocorrem anualmente 200 mil casos de FA, resultando em 30 mil óbitos (BRASIL, 2018).

Frequentemente a FA inicialmente se apresenta como uma infecção assintomática, porém o fígado é um dos órgãos mais afetados, podendo apresentar pontos necróticos, esteatose hepática, formação de corpos apoptóticos, entre outros. Como resultado da infecção aguda, molecularmente, pode ocorrer variações na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Nos casos graves, o tratamento não diminui a taxa de mortalidade, mesmo em unidades de terapia intensiva; e não há uma melhora no prognóstico do indivíduo infectado. Portanto, a vacinação ainda é a melhor forma de prevenção, apesar de existir um risco de desenvolver outras complicações como eventos adversos que podem ser fatais. Entretanto para melhorar a efetividade da vacina e desenvolver medicamentos, que possam diminuir a taxa viral no indivíduo infectado, é importante que haja mais pesquisas com o intuito de conhecer melhor a dinâmica do vírus a nível celular (GARDNER; RYMAN, 2010).

Desta forma esse trabalho visa avaliar *in vitro* as alterações na expressão gênica relacionada às citocinas pró e anti-inflamatórias, em hepatócitos de camundongos infectados experimentalmente com o vírus da febre amarela. Logo, com este trabalho espera-se conhecer melhor a ação *in vitro* do VFA nos hepatócitos de camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FEBRE AMARELA

O vírus da FA pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Os *Flavivirus* são diversos e se diferenciam através da replicação e sequência genômica. Existem duas classificações principais que distinguem os flavivírus: aqueles que são transmitidos por carrapatos e aqueles por mosquitos. Estes últimos também podem ser diferenciados através dos seus principais vetores, sendo que os do gênero *Culex* spp. tendem a transmitir vírus mais neurotrópicos e o *Aedes* spp. transmite vírus que ocasiona principalmente doenças viscerotrópica ou hemorrágica (BRASIL, 2018; CHAMBERS et al., 1990).

O genoma do VFA é formado por uma fita simples de RNA com polaridade positiva, composta por aproximadamente 11.000 nucleotídeos. Possui um cap de tipo I no terminal 5' e sem uma cauda polyA no terminal 3'. As estruturas necessitam de um cap para proteção do genoma durante a tradução através de exonucleases 5'-3'. O genoma possui uma região codificante que produz sete proteínas não estruturais, mas as extremidades 3' e 5' são regiões não codificantes. A região 5' é pequena e não possui muitas variações, diferente da 3' que possui 3 divisões com variações que dão origem às cepas de vírus (CHAMBERS et al., 1990). Conhecer a estrutura do genoma do VFA na interação entre o hospedeiro e também no vetor é uma base para entender como a conexão entre os três poderá influenciar na evolução da FA (KLITTING et al., 2018).

A FA silvestre ocorre pela transmissão entre primatas não humanos (PNH) e os mosquitos silvestres arbóreos, tais como: *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. no Brasil, e *Aedes stegomyia* na África. Grandes infestações (e mortes) de PNHs é tratada como um evento sentinela, ou seja, é uma epizootia. Como resultado, leva a necessidade em realização de campanhas de vacinação em humanos que residem ao entorno desta área silvestre (BRASIL, 2018).

Apesar de bastante estudada, a virologia, ecologia, evolução, imunologia e epidemiologia do VFA ainda não é completamente elucidada. Como resultado, houve uma epidemia entre 2015 e 2018 na região Sudeste do Brasil, onde foi identificada uma cepa viral em evolução com alta receptibilidade na população local, cerca de 45%

da população nacional (REZENDE et al., 2018).

A epizootia e epidemia da FA no Sul e Sudeste do Brasil ocorre por cinco fatores principais: 1) exposição da população à doença; 2) grande circulação de indivíduos com FA; 3) o surgimento de novas cepas virais; 4) alta densidade dos vetores e hospedeiros PNH; e 5) clima das regiões são favoráveis principalmente nos períodos chuvosos do ano. Existe a necessidade que explorem mais os fatores que facilitam o ressurgimento de epizootias e epidemias com o intuito de formar programas de prevenção (VASCONCELOS, 2010).

O fato de ser uma doença que se mantém através de epizootia, sua erradicação se torna muito difícil. Além disso existem humanos convivendo muito próximos das regiões em que há os PNH, elevando as chances de eventuais epidemias. Com isso, vem a grande importância de um sistema de saúde eficiente que ofereça vacinação para a população em grande escala (DE OLIVEIRA FIGUEIREDO et al., 2020; MONATH, 2012).

A vacina para imunizar a população da FA foi inserida no Brasil em 1937 (BRASIL, 2018). Ela pode ser aplicada a partir dos 09 meses de idade pela via subcutânea. Esta vacina é utilizada até os dias atuais e foi desenvolvida em Nova York em 1936, através de tecidos embrionários de rato e galinha derivado da cepa viral 17D do Asibi. Possui alta capacidade de reprodução e também de induzir uma resposta imunológica. Esta vacina atenuada é considerada a mais segura, e ainda assim pode ocasionar efeitos adversos (MONATH; VASCONCELOS, 2015; THEILER; SMITH, 1937). Dentre eles: febre, dor de cabeça e na extensão da coluna; já no local de aplicação pode desenvolver: eritema e algia. Efeitos sistêmicos se desenvolvem entre 3 a 7 dias após a imunização e se desenvolve na minoria dos indivíduos que são imunizados (MONATH, 2012).

Como já foi ressaltado, não existe tratamento específico para diminuir a carga viral da FA, porém alguns estudos estão sendo feitos visando formas de intervenções, como o uso do TY014, um anticorpo humano monoclonal IgG1, fabricado a partir de células ovarianas de hamsters chineses. O TY01 tem como alvo o epítipo da proteína do envelope do VFA e tem tido resultados positivos, inibindo sua infecção (LOW et al., 2020).

Outro tratamento em testes, é o uso do medicamento Sofosbuvir (DE FREITAS

et al., 2018) já utilizado para infecção crônica do Vírus da Hepatite C, principalmente em pacientes que desenvolveram complicações hepáticas (BHATIA et al., 2014). Sabe-se que esse medicamento inibe a replicação viral do VFA em hepatoma humano através de uma ligação a um aminoácido de uma polimerase do RNA do vírus (NS5). Resultando uma diminuição de mortalidade dos animais modelos (DE FREITAS et al., 2018) e demonstrando-se ser bastante eficiente no tratamento de outras doenças pertencentes aos vírus da família *Flaviviridae* em especial em pacientes com sintomas neurotrópicos quanto viscerotrópicos de FA (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2019).

2.2. MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA

O vírus contamina o indivíduo por meio da picada do mosquito, infectando as células dendríticas subcutâneas até atingir os linfonodos e se apresentados aos linfócitos T CD4⁺, iniciando a resposta imunológica. Uma vez nos linfonodos, podem ser drenados para a circulação sanguínea, tendo acesso a diversos órgãos, tais como: fígado, coração e rins (QUARESMA et al., 2013).

A FA se manifesta em três etapas: 1) presença de sintomas que se assemelham aos da gripe - mialgia, cefaleia, febre e fadiga. É a fase da infecção que pode ter um agravamento com hiperemia e sensibilidade hepática; 2) breve remissão da doença; 3) retorno dos sintomas de forma mais intensa - fase de intoxicação. Nesta última fase, o indivíduo pode desenvolver hemorragias, disfunção em diversos órgãos, icterícia, náuseas e vômito. Pacientes terminais podem também manifestar sintomas neurológicos como delírio, convulsão e coma (BRASIL, 2018; HOLBROOK, 2017).

Esta fase final de intoxicação ainda precisa ser mais bem estudada e as citocinas envolvidas no processo devem ser mais detalhadas (MONATH, 2001). Normalmente 20 a 50% dos pacientes que possuem o fígado e rins comprometidos morrem. Antes eles desenvolvem hipotensão, delírio, letargia, respiração de Cheyne-Stokes, acidose metabólica, hipercalemia, hipoglicemia e hipotermia. Pode haver aumento de pressão no fluido cerebrospinal, aumento de albumina, mas não em células brancas o que pode ocasionar em um edema cerebral (MONATH, 2001).

2.2.1. Acometimento hepático

O fígado é um órgão que desenvolve uma importante função no metabolismo

e no sistema imunológico (GAO; JEONG; TIAN, 2008; RACANELLI; REHERMANN, 2006). É composto por dois grandes grupos celulares: parenquimais e não parenquimais. No tipo parenquimal as mais importantes são os hepatócitos, e participam na regulação do metabolismo de carboidratos, na produção da bile para auxiliar na digestão e absorção de lipídios (APARICIO-VERGARA et al., 2017). No tipo não parenquimal, há as células de Kupffer, que são macrófagos hepáticos, são ativadas e participam da regulação imunológica. As lesões hepáticas podem ativar as células de Kupffer ocasionando um agravamento no processo inflamatório, já que estas células liberam mediadores inflamatórios, podendo ser essa a maior causa para o desenvolvimento da toxicidade hepática (APARICIO-VERGARA et al., 2017).

Quando há infecção viral no fígado o excesso metabólico, como consequência, pode danificar os hepatócitos, ocasionando apoptose. Isso ocorre pela cadeia de citocinas que sucedem o dano celular hepático com intuito de: remover ou reparar as células, realizar defesa contra a infecção e regenerar o tecido (DOOLEY; TEN DIJKE, 2012). Nesse processo, é possível que ocorra a formação de tecido fibroso, em resposta a sinalizações celulares de reparo que podem ativar miofibroblastos que irão produzir um tecido fibroso no parênquima (DOOLEY; TEN DIJKE, 2012; FABREGAT et al., 2016).

Foi identificado que o VFA tende a se replicar prioritariamente no fígado e é secretado em conjunto com mediadores solúveis e por isso ocasiona maiores danos a outros órgãos. Em macacos foi observado que há uma linfopenia deixando os rins e fígado mais suscetível ao VFA, sendo observado também uma desregulação na resposta do sistema imune, inibindo o tráfico de linfócitos e ruptura de ligações iônicas como o zinco acarretando assim um aumento de apoptose (ENGELMANN et al., 2014).

No fígado as células infectadas são os hepatócitos e células Kupffer, ocorrendo apoptose de hepatócitos, necrose lítica, hemorragia parenquimal, infiltração de células mononucleares inflamatórias e autólise (LEAL et al., 2016; QUARESMA et al., 2006a, 2013).

As lesões são responsáveis pelos sintomas que o indivíduo infectado pode desenvolver. Três citocinas são liberadas como consequência da apoptose celular e são acionadas pelas células com CD4⁺ e CD8⁺, elas são Fator de Necrose tumor (Tnf)

- α , Interferon gama (Ifn- γ) e Fator de Crescimento Transformante beta (Tgf- β) (QUARESMA et al., 2006a, 2013). Também foi observado células inflamatórias expressando CD45RO, CD20, S100, CD68 e CD57 (QUARESMA et al., 2007).

Tgf- β é uma das principais respostas de dano hepático, com papel importante para citostase e apoptose dos hepatócitos (KARKAMPOUNA et al., 2012). Pode ser encontrado em todas as fases de desenvolvimento de doenças (FABREGAT et al., 2016) possui a capacidade de inibir ou estimular a proliferação celular (MORIKAWA; DERYNCK; MIYAZONO, 2016). É suposto que em seres humanos infectados com VFA, o Tgf- β é o maior fator que induz a apoptose de hepatócitos, resultando na diminuição da resposta imune, e elevado dano tecidual (QUARESMA et al., 2006a).

O Tnf- α é uma citocina pleiotrópica, ou seja, diversas células são capazes de o liberar, como: macrófagos, células endoteliais vasculares (MAINI et al., 1995). Foi identificado que o Tnf- α estava presente em regiões hepáticas lesionadas com maior ocorrência de apoptose de hepatócitos, acredita-se que seja pela consequência de suas citocinas (QUARESMA et al., 2006a). O Tnf- α possui um papel importante na inflamação, acredita-se que sua função seja estimular liberação de citocinas tanto anti-inflamatórias quanto pró-inflamatórias como, Il-6, Il-8, GM-CSF, entre outras. Essa dinâmica foi identificada como uma forma de tratamento utilizando anti-Tnf para artrite reumatóide, porém se utilizado em excesso também diminui citocinas anti-inflamatórias das quais também são estimuladas pelo Tnf- α (Il-10 e Il-1ra). Conhecer essa dinâmica se tornou alvo para tratamento de diversas doenças, utilizando como base inibir parcialmente a liberação em excesso de Tnf- α (FELDMANN, 2009).

Woodson e Holbrook (2011) avaliaram os efeitos após 72 horas de infecção com VFA em hepatócitos PH5CH8 e encontraram altos níveis de citocinas pró inflamatórias: Il-6, Il-8 e Tnf- α . Avaliando histologicamente o fígado de pacientes com FA, foi possível identificar presença de Tnf- α , Ifn- γ , Il-10, Il-8, Il-4, Il-1 α e Il-1 β (QUARESMA et al., 2006a). A citocina IL-8 pode ser secretada por diversas células e é liberada para estimular a inflamação atraindo neutrófilos, e podem se modular morfo e funcionalmente excitando proteínas ou com alteração na respiração celular (BAGGIOLINI; CLARK-LEWIS, 1992). A Il-1 é uma citocina pró inflamatória e pode ocasionar febre, dano e remodelação tecidual (DINARELLO, 2009a). A isoforma Il-1 β , especificamente, trabalha em conjunto com quimiocinas para promover infiltração de

componentes inflamatórios da circulação (DINARELLO, 2009a, 2009b). A Il-6 é também altamente expressa em hepatócitos infectados com o VFA, regulando a fase de resposta aguda da doença, com a produção de fatores de coagulação, entretanto, níveis de fibrinogênio e PAI-1 não foram afetados (WOODSON; FREIBERG; HOLBROOK, 2013).

Ter Meulen et al. (2004), observou em pacientes que evoluíram ao óbito, elevados níveis de Il-6, MCP-1, Ip-10 e Tnf- α . O Ip-10, apesar de ser da família de quimiocinas CXC não tem a função de atrair neutrófilos, mas sim de atrair linfócitos T ativados (CHEN et al., 2013; STRIETER et al., 1995).

A Casp3 encontrada no trabalho de Holanda et al. (2019) estava elevado em ambos genótipos virais do quais foram estudados em células HepG2. Sua presença indica que está ocorrendo apoptose com estímulos intrínsecos, ou seja, há receptores na superfície celular que ao se ligarem com seus ligantes (FASL, Tnfa, Trail R1 ou R2) ocorre uma cascata interna da célula que ativa a Casp8/10 que irá agir na mitocôndria ativando a Casp3. Sua ação na apoptose ocorre realizando degradação nuclear, alterações no citoesqueleto (GUICCIARDI; GORES, 2005).

De modo geral, existem estudos sobre a ação de citocinas pró e anti-inflamatórias em hepatócitos, porém ainda carecem de maiores informações da ação dessas citocinas (Casp3, Il1- β , Il-8, Ip-10, Tgf- β e Tnf- α) em modelo de infecção com VFA, visando maior conhecimento da sua fisiopatologia, como de outras doenças virais hepatotóxicas (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar *in vitro* alterações na expressão gênica de hepatócitos infectados com o vírus da febre amarela.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a expressão de citocinas pró (Tnf- α , Ip-10, Il-1 β e Il-8) e anti-inflamatórias (Tgf- β) e indicadores de apoptose (Casp3) em hepatócitos murinos AML2 após 72 e 144 horas de infecção *in vitro* pelo vírus da febre amarela.

4. HIPÓTESE

Acreditamos que hepatócitos murinos infectados com o vírus da febre amarela apresentam variação de expressão gênica em citocinas pro e anti-inflamatórias desde estágios iniciais de infecção.

5. JUSTIFICATIVA

As células de camundongos foram escolhidas, pois estes são amplamente utilizados como modelo animal, devido ser capaz de mimetizar os problemas viscerotrópicos humanos (JULANDER, 2016). Explorando mais detalhadamente as alterações e a fisiopatologia da FA é possível dar subsídios para o desenvolvimento de outras formas de intervenções e tratamentos. Além disso torna-se viável compreender melhor outras doenças virais que ocasionam febre e hemorragias (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Logo, com este trabalho espera-se conhecer melhor a ação *in vitro* do VFA nas células hepáticas murinas.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, sob o protocolo com número 5182220219, aprovado no dia 08 de abril de 2020.

6.1. CULTIVO CELULAR

As células AML12 (código 0354) foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro. São células imortalizadas derivadas de *Mus musculus* e foram cultivadas com 90% de DMEM F12 (Gibco, #21041025), 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; LGC Biotecnologia), 0,1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina, LGC Biotecnologia, #BR30111-01), 0,005 mg/ml de Insulina, 0,005 mg/ml de Transferrina e 5 mg/ml de Selenium (ITS; Sigma Aldrich, #I3146), 40mg/ml de Dexametasona (Sigma Aldrich, #D4902), mantidas na estufa com 37° C e 5% de CO₂.

6.2. INFECÇÕES COM O VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Após estabelecer o cultivo dos hepatócitos AML12 com confluência de 80-90% de tapete celular, as culturas foram infectadas com o vírus da febre amarela cepa 17D (ZeptoMetrix Corporation, número de catálogo: 0810095CF). Foi feita a remoção do meio de cultivo das células, lavando com meio puro três vezes com 02 ml de DMEM/F12 puro. Em seguida, foi incubado o RNA do vírus por 1h, 37°C com 5% de CO₂. As placas foram observadas constantemente no microscópio ótico para avaliar o efeito citopático e foram mantidas por 72 (modelo para infecção aguda) e 144 (modelo para infecção crônica) horas após infecção. Outras placas foram mantidas sem infecção com o vírus para servir como controles negativos.

6.3. PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Para extração do mRNA das amostras (controle não infectado, 72h e 144h pós infecção), foi utilizado o reagente TRIzol (#15596, Ambion - Carlsbad, CA, USA). Para transcrição reversa e as reações de qPCR foram utilizadas as enzimas DNase I amplification grade (#18068-015) e RNaseOut Recombinant Ribonuclease Inhibitor (#10777-019); kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (#4374967); todos

adquiridos da Invitrogen (Foster City, CA, EUA) e as reações realizadas de acordo com recomendações dos fabricantes

Para cada reação de qPCR, foram utilizados 7,5 µL de SyBr Green PCR master mix; 1,0 mM de cada oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 1); 1,0 µL de cDNA diluído (3,0 µL de água ultra pura para 1,0 µL de cDNA), e água ultra pura para um total de 15,0 µL. Foi utilizado programa de ciclagem padrão do 7500 fast real-time PCR system (Invitrogen). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram todos adquiridos da Exxtend (Paulínia, SP, Brasil).

Quadro 1 - Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR

Símbolo	Sequência (5' – 3')
Tnfa	F: AGGCTGTCGCTACATCACTG R: CTCTCAATGACCCGTAGGGC
Tgfb1	F: CACCTGCAAGACCATCGACA R: TCCACCATTAGCACGCGG
Casp3	F: TGCAAAAAGGCTTTCCAGAG R: GCTGGATGCTTTCCAAGTCC
Il1b	F: GTGCAAGTGTCTGAAGCAGC R: AGCTTCTCCACAGCCACAAT
Il8	F: TGTTACAGGTGACTGCTCC R: AGCCCATAGTGGAGTGGGAT
Ip10	F: GCACCATGAACCCAAGTGCT R: ATCCCTTGAGTCCCACTCAGAC
Rnf187	F: GAGTGTGCCGATGACTGCTG R: CAGGTCCCGGGCATCATTTA
Ywhae	F: TGATCGGGAGGATCTGGTGT R: TCAACTGTCAGCTCCACGTC
Actb	F: GCTGACAGGATGCAGAAGGA R: GCTGGAAGGTGGACAGTGAG

Os dados foram analisados segundo o método de 2^{-ddCt} de Livak et al (2001) e a análise estatística foi realizada pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = General Linear Models) do programa SAS (versão 5.1). Os gráficos foram feitos no programa Microsoft Office Excel (versão 16.46).

7. RESULTADOS

Os hepatócitos foram infectados pelo VFA por 72 e 144 horas, para mimificar os efeitos agudos e crônicos, respectivamente. Entretanto, os dados referentes à infecção por 144 horas foram inconclusivos, porém continuam em andamento.

Às 72 horas de infecção com o VFA, os hepatócitos AML12 apresentaram diferenças de expressão para todos os genes estudados (Figura 1), exceto para Ip-10 (Figura 1d). Para Casp3 (Figura 1a) houve um aumento de expressão em 72% para as células infectadas quando comparadas com os controles. Da mesma forma, Il-1 β foi 102% superexpresso (Figura 1b), Il-8 45% (Figura 1c), Tgf- β 28% (Figura 1e) e Tnf- α 41% (Figura 1f), respectivamente.

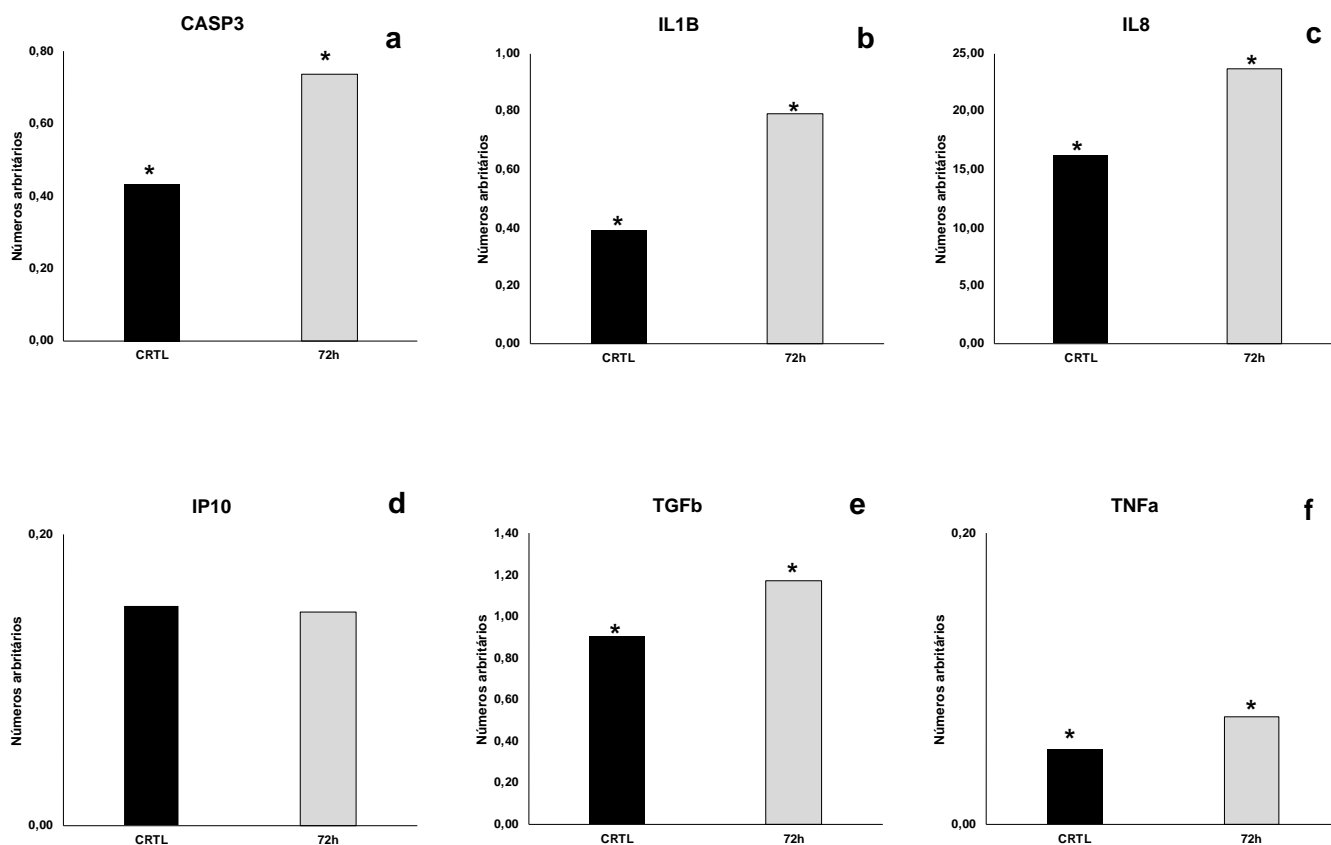


Figura 01: Diferenças de expressão gênica após 72 horas da infecção das células AML12 com o VFA. Asteriscos representam diferença estatísticas a nível maior ou igual de 5% de probabilidade.

8. DISCUSSÃO

A presença de casp3 estava elevada em relação ao controle, combinando com os achados de Holanda et al. (2019) que avaliou dois genótipos de vírus em células HepG2, e a Casp3 estava presente na infecção de ambas. Defendendo que na medida em que existe um avanço da doença ocorre uma elevação na expressão da casp3. Ao avaliar a histologia do fígado humano que foram acometidos pela FA, foi observado a presença da proteína Fas no citoplasma do hepatócito (QUARESMA et al., 2006a). Contudo, é uma proteína que pode ser expressada pela indução de vírus quanto por Il-1 e Tnf- α . Portanto, sua presença pode indicar a apoptose de hepatócitos onde há ativação da casp3, considerando que a morte celular de hepatócitos é realizada quase de forma exclusiva pela sinalização Fas (GUICCIARDI; GORES, 2005). Em um estudo sobre hepatite C em camundongos transgênicos em que tiveram anticorpos contra a proteína Fas, houve uma diminuição das casp3/7 (MACHIDA et al., 2001).

Woodson e Holbrook (2011), em seus achados, as células controle, sem presença do VFA expressaram mais Tgf- β 1 do que os hepatócitos infectados, acreditando que a liberação desse gene ocorre por outras células e indica que a sua liberação na dinâmica da FA deve ser melhor estudada. Porém no nosso estudo com hepatócitos infectados com VFA houve uma elevação na expressão do Tgf- β 1, diferindo dos resultados. Na histologia de fígados de humanos com VFA, utilizando imunomarcadores, foi observado intensa presença de Tgf- β (QUARESMA et al., 2006a, 2013). A presença de Tgf- β 1 em infecções virais possui uma ação de diferenciar células regulatórias T que possuem ações anti-inflamatórias, porém, também realiza regulação da diferenciação de células pró e anti-inflamatórias (KARIMI-GOOGHERI et al., 2014). Também possui uma característica pró-apoptótica e sua presença elevada no tecido hepático pode ocasionar dano tecidual (QUARESMA et al., 2013; QUARESMA; DUARTE; VASCONCELOS, 2006).

Os dados do Ip-10 não condizem com os achados Rezende et al. (2020), que encontrou elevados níveis em um paciente com febre amarela após 36 dias de sintomas, também encontrou elevação do Il-1 β e Tnf- α , assim como os nossos resultados. O Ip-10 em seu estudo se manteve elevado até o dia 76 pós infecção, começou a diminuir 197 dias após o início dos sintomas.

Ter Meulen et al. (2004), também avaliou em pacientes que tiveram FA a nível não fatal, com sintomas hemorrágicos e com um prognóstico fatal, foi observado uma diferença em cada caso, sendo níveis de Ip-10 ficaram com elevadas expressões na medida em que o paciente ficava mais acometido, o mesmo ocorreu com Tnf- α .

O Ip-10 pode se ligar a um linfócito T que está normalmente presente em inflamações crônicas. A presença do Ip-10 estimulado pelo Ifn- γ e pode ser expressado por diversas células hepáticas, inclusive o hepatócito (CHEN et al., 2013; MARRA; TACKE, 2014). Holt et al. (2009) ao estudar inflamações em células de miofibroblastos hepáticos ativados derivados de células estreladas hepáticas, observou que além do Ifn- γ , Tnf- α também induz a secreção de Ip-10.

O Ip-10 se liga ao CXCR3 que estimula diversas sinalizações inflamatórias em áreas que estão lesionadas, inclusive, estudos mostram que em áreas necrosadas do fígado o Ip-10 em conjunto com CXCR3 auxilia na infiltração de linfócitos T, isso foi observado tanto em doenças autoimune quanto em hepatites virais crônicas (NISHIOJI et al., 2001). Também já foi observado em um estudo com camundongos que, níveis elevados de Ip-10 permite o desenvolvimento de fibrose no fígado, enquanto quando havia níveis mais baixos, a fibrose também era menor (HINTERMANN et al., 2010). Bone-Larson et al. (2001) em sua pesquisa avalia que o Ip-10 também pode agir como regulador de proliferação dos hepatócitos.

Em 72h o Tnf- α estava elevado assim como o Il-8, Holanda et al. (2019) observou também uma crescente no decorrer das horas pós infecção e acredita que isso indica a progressão da FA e ressalta que existe a necessidade de mais estudos que avaliem as expressões gênicas em períodos maiores que 96h pós infecção. É importante ressaltar a importância do detalhamento desses processos sistêmicos, principalmente em relação à liberação das citocinas: Tnf- α , Ifn- γ , Tgf- β e Il-6. Pois, será uma base não apenas para entender a FA mas também outras doenças que desenvolvem febre hemorrágica (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

É conhecido que Tnf- α e Ifn- γ participam, assim como o ligante do receptor Fas, para que ocorra a apoptose das células (QUARESMA et al., 2006b). Ambos em conjunto com o Tgf- β foram encontrados em altas quantidades em pacientes com casos fatais da FA enquanto os níveis de expressão de Il-1 β e Il-8 estavam mais baixos (QUARESMA et al., 2013).

O Tnf- α quando estimulado pode secretar o Il-1 β , que tem como função promover a inflamação, dano e remodelamento tecidual. Como sintoma, pode ocasionar febre e anorexia (DINARELLO, 2009b). Porém o Tnf- α possui a capacidade de estimular a liberação de outras citocinas pró-inflamatória (FELDMANN, 2009). O Il-8 só estará presente se houver uma elevação das expressões de Tnf e Il1. Porém, o Il-8 age em infecções, isquemia, traumas e em situações diversas em que não há homeostasia do tecido. Sua presença também pode atrair neutrófilos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989).

9. CONCLUSÃO

Os resultados adquiridos confirmam a hipótese, existe modificações na expressão gênica nos estágios iniciais da doença FA em que a maioria dos genes estudados demonstraram elevações em suas expressões. Havendo presença de diversas citocinas pró inflamatórias que podem estimular a apoptose celular, além de haver elevada expressão da Casp3 nos estágios iniciais que pode indicar morte celular. Logo, esperamos os próximos resultados para poder realizar uma avaliação de forma comparada com o período em que a doença já está instalada.

REFERÊNCIAS

- APARICIO-VERGARA, M. et al. Isolation of Kupffer Cells and Hepatocytes from a Single Mouse Liver. In: **Borel F., Mueller C. (eds) Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1639p. 161–171.
- BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Letters**, v. 307, n. 1, p. 97–101, 1992.
- BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 4, p. 1045–1049, 1989.
- BHATIA, H. K. et al. Sofosbuvir: A novel treatment option for chronic hepatitis C infection. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 5, n. 4, p. 278–284, 2014.
- BONE-LARSON, C. L. et al. IFN- γ -Inducible Protein-10 (CXCL10) Is Hepatoprotective During Acute Liver Injury Through the Induction of CXCR2 on Hepatocytes. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 12, p. 7077–7083, 2001.
- BRASIL. Febre amarela: guia para profissionais de saúde. In: **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 67.
- CHAMBERS, T. J. et al. AND REPLICATION ORGJ \ NIZATION , EXPRESSION , I. **Genome**, 1990.
- CHEN, L. J. et al. CXC chemokine IP-10: A key actor in liver disease? **Hepatology International**, v. 7, n. 3, p. 798–804, 2013.
- DE FREITAS, C. S. et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **bioRxiv**, p. 1–22, 2018.
- DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P. et al. Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016-2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, v. 12, n. 11, 2020.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. June, p. 519–550, 2009a.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 β and the Autoinflammatory Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 23, p. 2467–2470, 2009b.
- DOOLEY, S.; TEN DIJKE, P. TGF- β in progression of liver disease. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 1, p. 245–256, 2012.

- ENGELMANN, F. et al. Pathophysiologic and Transcriptomic Analyses of Viscerotropic Yellow Fever in a Rhesus Macaque Model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.
- FABREGAT, I. et al. TGF- β signalling and liver disease. **FEBS Journal**, v. 283, p. 2219–2232, 2016.
- FELDMANN, M. Translating molecular insights in autoimmunity into effective therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 1–27, 2009.
- GAO, B.; JEONG, W. IL; TIAN, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 729–736, 2008.
- GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. (Special Issue: Emerging pathogens.). **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 237–260, 2010.
- GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 1024–1033, 2005.
- HINTERMANN, E. et al. CXCL10 promotes liver fibrosis by prevention of NK cell mediated hepatic stellate cell inactivation. **Journal of Autoimmunity**, v. 35, n. 4, p. 424–435, 2010.
- HOLANDA, G. M. et al. Yellow fever virus modulates cytokine mRNA expression and induces activation of caspase 3/7 in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. **Archives of Virology**, v. 164, n. 4, p. 1187–1192, 2019.
- HOLBROOK, M. R. Historical perspectives on flavivirus research. **Viruses**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2017.
- HOLT, A. P. et al. Liver Myofibroblasts Regulate Infiltration and Positioning of Lymphocytes in Human Liver. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 705–714, 2009.
- JULANDER, J. G. Animal models of yellow fever and their application in clinical research. **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 64–69, 2016.
- KARIMI-GOOGHERI, M. et al. Important Roles Played by TGF- β in Hepatitis B Infection. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 102–108, 2014.
- KARKAMPOUNA, S. et al. TGF β Signaling in Liver Regeneration. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 27, p. 4103–4113, 2012.
- KLITTING, R. et al. What does the future hold for yellow fever virus? (II). **Genes**, v. 9, n. 9, 2018.

- LEAL, S. G. et al. Frequency of histopathological changes in howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 29–33, 2016.
- LOW, J. G. et al. Phase 1 Trial of a Therapeutic Anti–Yellow Fever Virus Human Antibody. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 5, p. 452–459, 2020.
- MACHIDA, K. et al. Inhibition of Cytochrome c Release in Fas-mediated Signaling Pathway in Transgenic Mice Induced to Express Hepatitis C Viral Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 15, p. 12140–12146, 2001.
- MAINI, R. N. et al. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) blockade in rheumatoid arthritis (RA). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 101, n. 2, p. 207–212, 1995.
- MARRA, F.; TACKE, F. Roles for chemokines in liver disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 577- 594.e1, 2014.
- MONATH, T. P. Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001.
- MONATH, T. P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. v. 11, n. 4, p. 427–448, 2012.
- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.
- MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. 1–24, 2016.
- NISHIOJI, K. et al. Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 123, n. 2, p. 271–279, 2001.
- QUARESMA, J. A. S. et al. Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. **Virology**, v. 345, n. 1, p. 22–30, 2006a.
- QUARESMA, J. A. S. et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. **Virus Research**, v. 116, n. 1–2, p. 91–97, 2006b.
- QUARESMA, J. A. S. et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in

- yellow fever infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 2, p. 161–168, 2007.
- QUARESMA, J. A. S. et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: Progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews in Medical Virology**, v. 23, n. 5, p. 305–318, 2013.
- QUARESMA, J. A. S.; DUARTE, M. I. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Midzonal lesions in yellow fever: A specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 3, p. 618–621, 2006.
- RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2 SUPPL. 1, 2006.
- REZENDE, I. M. et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. p. 1–12, 2018.
- REZENDE, I. M. et al. Late-relapsing hepatitis after yellow fever. **Viruses**, v. 12, n. 2, 2020.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Sofosbuvir use for yellow fever: a new perspective treatment. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 5, p. 207–208, 2019.
- STRIETER, R. M. et al. THE ROLE OF CXC CHEMOKINES AS REGULATORS OF ANGIOGENESIS. **Shock**, v. 4, n. 3, p. 155–160, 1995.
- TER MEULEN, J. et al. Activation of the Cytokine Network and Unfavorable Outcome in Patients with Yellow Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 10, p. 1821–1827, 2004.
- THEILER, M.; SMITH, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. **The journal of experimental medicine**, n. 8, p. 767–786, 1937.
- VASCONCELOS, P. F. DA C. Febre amarela no Brasil: Reflexões e hipóteses sobre a emergência em áreas previamente livres. **Revista de Saude Publica**, v. 44, n. 6, p. 1144–1149, 2010.
- WHO. Small bites Big threats - Yellow Fever. **Fact Sheet no. 100**, n. 2005, p. 2014, 2014.
- WOODSON, S. E.; FREIBERG, A. N.; HOLBROOK, M. R. Coagulation factors, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1, are differentially regulated by

yellow fever virus infection of hepatocytes. **Virus Research**, v. 175, n. 2, p. 155–159, 2013.

WOODSON, S. E.; HOLBROOK, M. R. Infection of hepatocytes with 17-D vaccine-strain yellow fever virus induces a strong pro-inflammatory host response.

Journal of General Virology, v. 92, n. 10, p. 2262–2271, 2011.