



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DO GRUPO GAMBOA
(*BUNYAVIRIDAE*, *ORTHOBUNYAVIRUS*) ISOLADOS NAS AMÉRICAS E
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PINTOS (*GALLUS GALLUS*
DOMESTICUS) COM O VÍRUS GAMBOA CEPA BE AN 439546.**

JANNIFER OLIVEIRA CHIANG

BELÉM - PARÁ

2010

JANNIFER OLIVEIRA CHIANG

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DO GRUPO GAMBOA
(*BUNYAVIRIDAE*, *ORTHOBUNYAVIRUS*) ISOLADOS NAS AMÉRICAS E
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PINTOS (*GALLUS GALLUS*
DOMESTICUS) COM O VÍRUS GAMBOA CEPA BE AN 439546.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

BELÉM - PARÁ

2010

JANNIFER OLIVEIRA CHIANG

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DO GRUPO GAMBOA
(*BUNYAVIRIDAE*, *ORTHOBUNYAVIRUS*) ISOLADOS NAS AMÉRICAS E
INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PINTOS (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*)
COM O VÍRUS GAMBOA CEPA BE AN 439546.

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de
Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de
Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.**

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos,
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas,
Instituto Evandro Chagas.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas,
Instituto Evandro Chagas.

Profa. Dra. Conceição de Maria de Almeida Vieira
Instituto da Saúde de Produção Animal,
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA.

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Núcleo de Medicina Tropical,
Universidade Federal do Pará - UFPA.

Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas,
Instituto Evandro Chagas.

Dra. Elizabeth Salbe Travassos da Rosa (Suplente)
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
Instituto Evandro Chagas

Dr. José Antônio Picanço Diniz Junior (Suplente)
Unidades de Microscopia Eletrônica
Instituto Evandro Chagas

Belém, 31 de Março de 2010

EPÍGRAFE

“Amai a Deus sobre todas as coisas e
ao teu próximo como a ti mesmo”

Jesus

"Não importa o que fizeram a você.
O que importa é o que você faz com
aquilo que fizeram para você".

Jean-Paul Sartre (1905-1980)
Filósofo francês

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada mãe, Nady Chiang, por seu amor e dedicação incondicional a minha formação moral e educacional; e ao meu companheiro de caminhada, Paulo Carvalho, por ser meu sol meu céu, meu mar. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai de todos nós, Deus, por seu infinito amor, bondade e justiça. Por acreditar em nosso crescimento espiritual, dando-nos a abençoada oportunidade de resgatarmos nossos erros, frutos de nossas imperfeições, e desta forma evoluir na seara do bem e do amor.

À minha amada Mãe, Nady Chiang, por ser meu porto seguro e luz em minha caminhada evolutiva. Pessoa iluminada a quem Deus deu me deu a grande benção de ser minha mãe. Exemplo de paciência, bondade, amor e dedicação. Mãezinha, agradeço-te por todos os ensinamentos morais, éticos e espirituais, por sempre estar ao meu lado incondicionalmente. Amo-te ontem, hoje e por toda a eternidade, pois que esse sentimento, o AMOR, é eterno.

Ao meu amado companheiro de caminhada, amigo, confidente, amante e esposo, Paulo Carvalho Filho, obrigada por ser a pessoa maravilha que és, por teu amor, carinho, compreensão, admiração e paciência. Exemplo de dignidade, honestidade e respeito para com o próximo. Agradeço todos os dias a Deus por permitir nosso reencontro. Amo-te eternamente.

À família Chiang (Chiang (*in memoriam*), Nachy, Hawsen, Fernanda, Carolina, Anderson e Giovana) por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos. Sei da admiração e carinho de vocês por mim. Agradeço o apoio e incentivo em todos os momentos difíceis de minha vida. Amo vocês.

À minha nova família Carvalho (Paulo, Marieta e Joana), por terem me recebido com muito amor e carinho e por adotarem-me com filha. Agradeço o amor, apoio e incentivo em todas as horas. Amo vocês.

Ao meu orientador, Dr. Pedro Vasconcelos, por todos os ensinamentos na área de arbovirologia, apoio e orientação, e por acreditar em minha capacidade profissional, sempre incentivando meu crescimento dentro da seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas. Exemplo de profissional competente e sério.

Aos amigos da sorologia I, Lúvia Carício, Daniele Henriques, Milene Ferreira e Basílio Buna, por todo o apoio nas horas que precisei ausentar-me do laboratório, pela ajuda e pelos momentos de descontração. É um prazer estar trocando conhecimentos e experiências com vocês.

Aos colegas da biologia molecular, Adriana, Maira e Clayton pela ajuda com o sequenciamento das amostras, e em especial ao Samir Casseb, por toda sua ajuda com as técnicas de biologia molecular e a paciência em repetir várias vezes as análises dos dados genéticos.

Às colegas da cultura celular, Valéria Carvalho e Eliana Pinto, pela ajuda com os cultivos de células VERO, sempre atendendo os meus inúmeros pedidos para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Dr. Márcio Nunes por sua ajuda com a análise filogenética e por ser o intermediário com os pesquisadores da Universidade de Galveston,

Texas, nos Estados Unidos, que enviaram parte das informações deste trabalho, em especial a Dra. Amélia Travassos da Rosa e Dr. Robert Tesh, por sua colaboração com os dados sorológicos.

Ao Dr. Juarez Quaresma por sua colaboração com a análise histopatológica e imunohistoquímica das amostras do estudo experimental.

À família arbovírus por toda a ajuda em inúmeros momentos de minha carreira profissional, acrescentando conhecimentos e informações. Pelos momentos de descontração durante os intervalos do laboratório.

Às eternas amigas Flávia, Dani e Fabíola pela amizade e carinho, que mesmo longe devido à correria do dia a dia, sempre estamos torcendo pela felicidade uma da outra, estando juntas, sempre que possível, nos momentos de dificuldades e de alegria. Amos vocês amigas!

Ao instituto Evandro Chagas pela oportunidade de conhecer e participar do mundo da pesquisa científica e biomédica.

À universidade Federal do Pará por tornar possível a minha formação profissional desde a graduação até o doutorado.

À FAPESPA pelo apoio financeiro durante parte do desenvolvimento deste trabalho.

À todos meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	16
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i>	23
1.1.1 Características Gerais.....	23
1.1.2 Estrutura viral.....	26
1.1.2.1 Morfologia e organização estrutural.....	26
1.1.2.2 Propriedades bioquímicas e biofísicas.....	28
1.1.3 Estrutura e Organização Genética.....	28
1.1.3.1 Genoma Viral.....	28
1.1.3.2 Estratégia de Codificação do Genoma Viral.....	29
1.1.4 Ciclo de Replicação Viral.....	32
1.1.5 Classificação e Taxonomia Viral.....	34
1.2 GÊNERO <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i>	35
1.2.1 Genoma e Proteínas dos Orthobunyavirus.....	36
1.2.1.1 Segmento L – Proteína L.....	36
1.2.1.2 Segmento M – Glicoproteínas Gn / Gc e Proteína NSm.....	38
1.2.1.3 Segmento S – Proteínas N e NSs.....	40
1.2.2 Transmissão dos Orthobunyavírus.....	41

1.2.3	Epidemiologia dos Orthobunyavírus.....	42
1.2.3.1	Grupo Antigênico Anopheles A.....	42
1.2.3.2	Grupo Antigênico Califórnia.....	43
1.2.3.3	Grupo Antigênico Bunyamwera.....	44
1.2.3.4	Grupo Antigênico Simbu.....	45
1.2.3.5	Grupo Antigênico C.....	46
1.2.3.6	Grupo Antigênico Guamá.....	47
1.2.3.7	Demais Grupos Antigênicos.....	47
1.3	SOROGRUPO GAMBOA – <i>VÍRUS GAMBOA</i> (VGAM).....	48
1.4	MOSQUITO <i>Aedeomyia squamipennis</i>	54
1.5	OBJETIVOS.....	55
1.5.1	Objetivo Geral.....	55
1.5.2	Objetivos Específicos.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1	AMOSTRAS.....	56
2.2	PROPAGAÇÃO DOS VÍRUS PARA PRODUÇÃO DE ESTOQUE VIRAL.....	58
2.3	ESTUDOS MOLECULARES.....	58
2.3.1	Extração do RNA Viral.....	59
2.3.2	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR).....	60
2.3.3	Análise do Produto da RT-PCR.....	62
2.3.4	Purificação do DNA Complementar.....	62
2.3.5	Sequenciamento Nucleotídico das Amostras Virais.....	63

2.3.6	Análise Filogenética Comparativa	64
2.4	ESTUDO EXPERIMENTAL EM PINTOS RECÉM-NASCIDOS (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	67
2.4.1	Histopatologia e Imunohistoquímica	68
2.5	ESTUDO SOROLÓGICO.....	70
2.5.1	Produção de Antígeno Sucrose-Acetona	70
2.5.2	Teste de Inibição da Hemaglutinação	71
2.5.3	Teste de Fixação do Complemento	74
2.5.4	Teste de Neutralização	75
3	RESULTADOS	77
3.1	ESTOQUE E PROPAGAÇÃO VIRAL.....	77
3.2	ESTUDO MOLECULAR.....	79
3.2.1	Amplificação dos produtos da RT-PCR para o segmento M- RNA dos vírus do grupo Gamboa	79
3.2.2	Análise Filogenética	80
3.2.3	Relação genética	83
3.3	ESTUDO EXPERIMENTAL EM PINTOS (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	85
3.3.1	Estudo Histopatológico e Imunohistoquímico	85
3.3.1.1	Alterações histológicas.....	85
3.3.1.2	Detecção de antígenos para o VGAM em tecidos de pintos (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	89
3.4	ESTUDO SOROLÓGICO.....	91
3.4.1	Detecção de anticorpos Inibidores da Hemaglutinação	91

3.4.2	Relação antigênica em Teste de Fixação do Complemento.....	95
4	DISCUSSÃO.....	97
5	CONCLUSÕES.....	107
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esquema da organização estrutural e morfologia dos integrantes da família <i>Bunyaviridae</i>	27
Figura 2 – Organização e estratégia de codificação dos segmentos genômicos dos integrantes da família <i>Bunyaviridae</i>	31
Figura 3 – Esquema do ciclo de replicação dos vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	33
Figura 4 – Organização do sorogrupo Gamboa com seus dois complexos antigênicos.....	49
Figura 5 – Distribuição geográfica dos vírus do sorogrupo Gamboa.....	51
Figura 6 – Provável ciclo de manutenção dos vírus do sorogrupo Gamboa.....	53
Figura 7 – Mosquito da espécie <i>Aedeomyia squamipennis</i>	54
Figura 8 – Fotomicrografia de contraste de fase mostrando cultivo de célula VERO controle, demonstrando a monocamada confluenta de células de aspecto fusiforme (A); e ECP causado pela infecção da cepa BE AR513690 do VGAM no 5º dia p.i, demonstrando a destruição da monocamada celular com arredondamento das células - setas (B).....	78
Figura 9 – Visualização dos produtos de RT-PCR para o segmento M-RNA em gel de agarose a 1,2% para as 12 cepas brasileiras de VGAM.....	80

- Figura 10** – Árvore filogenética pelos métodos de MV (*bootstrap* em parênteses) e Bayesiano (probabilidade posterior fora do parêntese) das sequências nucleotídicas parciais do segmento M-RNA, gene Gn, dos grupos Bunyamwera, Encefalite Califórnia, Gamboa, Simbu e Turlock..... 82
- Figura 11** – Fotomicrografia de campo claro (HE) de tecido pulmonar de pinto da espécie *Gallus gallus domesticus*, controle (A) e infectado com a cepa do VGAM Be AN 439546 pela via s.c., no 7º dia p.i., mostrando hemorragia (círculo), congestão de vasos (setas) e espessamento das trabéculas pulmonares (*) (B); e infiltrado inflamatório - setas (C)..... 87
- Figura 12** – Fotomicrografia de campo claro (HE) de tecido hepático de ave da espécie *Gallus gallus domesticus* controle (A) e infectado com a cepa do VGAM Be AN 439546 pela via s.c., no 7º dia p.i., mostrando infiltrado inflamatório perivascular – setas (B) e tumefação de hepatócitos – setas (C)..... 88
- Figura 13** – Fotomicrografia de campo claro (HE) de tecido renal de ave da espécie *Gallus gallus domesticus* infectado com a cepa do VGAM Be AN 439546, pela via s.c., no 7º dia p.i., demonstrando tumefação das células dos túbulos renais..... 89
- Figura 14** – Fotomicrografia de campo claro (imunohistoquímica) de amostras teciduais de ave da espécie *Gallus gallus domesticus* infectada com a cepa do VGAM Be AN 439546 pela via s.c., no 7º dia p.i. A – Imunomarcagem acastanhada no citoplasma de células de tecido pulmonar (setas); B – tecido hepático mostrando hepatócitos imunomarcados (setas); C – tecido renal mostrando o citoplasma de células de túbulos renais imunomarcadas (setas)..... 90

Figura 15 – Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação em amostras de plasma de aves, soros de outros animais silvestres (répteis, roedores, marsupiais, primatas não humanos, edentados e carnívoros) e de humanos coletados no município de Tucuruí, Estado do Pará..... 91

Figura 16 – Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação em amostras de soro de pintos (*Galus galus domesticus*) infectados com a cepa viral BE AN 439546 do VGAM, através das vias i.c. e s.c..... 95

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pagina
Quadro 1 – Principais vírus da família <i>Bunyaviridae</i> que causam doença em humanos, outros vertebrados e plantas.....	25
Quadro 2 – Sequência nucleotídica dos terminais 5' e 3' dos genes S, M e L de representantes da família <i>Bunyaviridae</i>	29
Quadro 3 – Principais integrantes virais do gênero <i>Orthobunyavirus</i>	35
Quadro 4 – Cepas de <i>Vírus Gamboa</i> do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas que foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.....	57
Quadro 5 – Cepas de <i>Vírus Gamboa</i> do acervo da <i>University of Texas Medical Branch</i> (UTMB) que foram utilizadas para o desenvolvimento de parte deste trabalho.....	58
Quadro 6 – Iniciadores utilizados na técnica de RT-PCR para amplificação do genoma dos VGAM em estudo.....	61
Quadro 7 – Sequências do segmento M-RNA de <i>Orthobunyavirus</i> utilizados para realizar a análise filogenética comparativa com os vírus do sorogrupo <i>Gamboa</i>	65
Quadro 8 – Representação dos valores usados na leitura do teste de FC de acordo com a percentagem de hemólise das hemácias de carneiro.....	75

Quadro 9 – Relação dos dias de coleta pós-infecção das cepas do VGAM em células VERO e camundongos albinos suíços recém nascidos.....	79
Quadro 10 – Distribuição das aves de acordo com espécie, família e nome vulgar, que apresentaram anticorpos para o VGAM no teste de IH com seus respectivos títulos.....	93
Quadro 11 – Resultados dos testes cruzados de fixação do complemento com amostras de vírus do grupo Gamboa, isoladas na área de Tucuruí, nos anos de 1982 a 1988.....	96
Tabela 1 – Valores percentuais de divergência aminoacídica e nucleotídica obtidos a partir de sequências nucleotídicas parciais da glicoproteína de superfície Gn, segmento M-RNA, dos vírus do sorogrupo Gamboa.....	84
Tabela 2 - Divergência genética com base nas sequências nucleotídicas parciais do gene Gn entre os grupos filogenéticos.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
Δ dir	Divergência genética
μ g/mL	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitro
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
AV	Agrupamento de vizinhos
cDNA	Ácido dextrorribonucléico complementar
CITV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
cm ²	Centímetro quadrado
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Gás carbônico
CsCl	Cloreto de Césio
DGV	Dextrose, Gelatina e Veronal
DL ₅₀ /0,02mL	Dose letal mínima para matar 50% dos camundongos infectados com 0,02 mL da suspensão viral
DNA	Ácido desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efeito citopático
EDTA	Etileno-diamino tetra acetato de sódio
FC	Fixação do complemento
g/cm ³	Grama por centímetros cúbicos
HE	Hematoxilina – eosina

i.c.	Intracerebral
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFN	Interferon
IH	Inibição da hemaglutinação
ILN	Índice logarítmico de neutralização
Kb	Kilobases
kDa	Kilodáton
L	Segmento grande
M	Segmento médio
mG	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Micromolar
MP	Máxima parcimônia
MV	Máxima verrosimilhança
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanogramas
nt	Nucleotídeos
°C	Grau Centígrados
ORF	Matriz de leitura aberta (<i>Open Reading Frame</i> – ORF)
P.A	Puro Absoluto
p.i.	Pós infecção
PBS	Solução salina tamponada (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico

pmol	Picomoles
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNC	Ribonucleoproteína
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase
S	Segmento pequeno
s.c.	Sub cutânea
SAARB	Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
SNC	Sistema nervoso central
TA	Temperatura ambiente
TN	Teste de neutralização
U	Unidade
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
UV	Ultravioleta
VAINO	<i>Vírus Aino</i>
VAKA	<i>Vírus Akabane</i>
VALJ	<i>Vírus Alajuela</i>
VAPEU	<i>Vírus Apeu</i>
VBAT	<i>Vírus Batai</i>
VBL	<i>Vírus Brus Laguna</i>
VBUN	<i>Vírus Bunyamwera</i>

VCAR	<i>Vírus Caraparu</i>
VCATU	<i>Vírus Catu</i>
VCV	<i>Vírus Cache Valley</i>
VEC	<i>Vírus da Encefalite Califórnia</i>
VEMV	<i>Vírus da Encefalite de Murray Valley</i>
VERO	Linhagem celular de rim de macaco <i>Cercopithecus aethiops</i>
VESL	<i>Vírus da Encefalite Saint Louis</i>
VGAM	<i>Vírus Gamboa</i>
VGMA	<i>Vírus Guama</i>
VGRO	<i>Vírus Guaroa</i>
VINK	<i>Vírus Inkoo</i>
VITQ	<i>Vírus Itaquí</i>
VJC	<i>Vírus Jamestown Canyon</i>
VKK	<i>Vírus Kaeng Khoi</i>
VLAC	<i>Vírus La Crosse</i>
VMAD	<i>Vírus Madrid</i>
VMEL	<i>Vírus Melao</i>
VMTB	<i>Vírus Marituba</i>
VMUR	<i>Vírus Murutucu</i>
VNEP	<i>Vírus Nepuyo</i>
VNO	<i>Vírus do Nilo Ocidental</i>
VORI	<i>Vírus Oriboca</i>
VORO	<i>Vírus Oropouche</i>
VOSSA	<i>Vírus Ossa</i>

VPV	<i>Virus Pueblo Viejo</i>
VRES	<i>Virus Restan</i>
VRFV	<i>Virus Rift Valley</i>
VSJ	<i>Virus San Juan</i>
VSSH	<i>Virus Snowshoe hare</i>
VTAH	<i>Virus Tahyna</i>
VTM	<i>Virus Tacaiuma</i>
VTVT	<i>Virus Trivittatus</i>
VUMB	<i>Virus Umbre</i>
VUSU	<i>Virus Usutu</i>
VUUK	<i>Virus Uukuniemi</i>
VXIG	<i>Virus Xingu</i>

RESUMO

Poucas informações estão disponíveis até o momento sobre os vírus do sorogrupo Gamboa (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*), desta forma, foi realizado, neste trabalho, estudo filogenético dos membros do sorogrupo Gamboa entre si e com outros orthobunyavírus ao nível gene Gn (M-RNA), além de infecção experimental em pintos recém nascidos da espécie *Gallus gallus domesticus* com a cepa Be AN 439546 do *Vírus Gamboa* (VGAM), e estudo sorológico em aves, outros animais silvestres e humanos de Tucuruí – Pará. A análise filogenética dos vírus do sorogrupo Gamboa demonstrou que esses vírus são geneticamente mais relacionados com membros do grupo Turlock e menos com os do grupo Simbu, e foram distribuídos em dois clados distintos (I e II), que estão de acordo com a atual classificação sorológica, de modo que o clado I inclui o complexo Gamboa e o clado II o complexo Alajuela. A cepa Be AN 439546 do VGAM apresentou tropismo pelo pulmão e fígado de pintos recém nascidos experimentalmente infectados, sendo a replicação viral nesses órgãos confirmada por imunohistoquímica, o que demonstra que o VGAM replica-se nessa ave. A detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o VGAM e a confirmação por teste de neutralização em plasma de aves silvestres reforça a hipótese de que esses animais constituem o principal hospedeiro de amplificação no ciclo de manutenção do VGAM. Estudos moleculares do genoma completo dos vírus do sorogrupo Gamboa, assim como sobre a ecoepidemiologia do vetor e dos hospedeiros (principalmente aves), para o ciclo de replicação dos vírus, são importantes para confirmar as informações já existentes sobre esses vírus.

ABSTRACT

Presently, little information on Gamboa serogroup viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) is available. Thus, in this work, it was performed a comparative phylogenetic study on the members of the Gamboa serogroup and with other orthobunyaviruses to the level of the gene Gn (M-RNA); an experimental infections in the domestic bird (*Gallus domesticus*) using the strain Be AN 439546 of the *Gamboa Virus* (GAMV); and a serologic study using the Hemagglutination Inhibition (HI) test in serum samples of wild animals and humans collected in Tucuruí - Pará. The phylogenetic analysis of Gamboa group viruses demonstrated that they are genetically closely related to group Turlock viruses and less related to the Simbu group viruses. The group Gamboa viruses were distributed in two clades (I and II), that it is in agreement with the current serologic classification; the clade I correspond to the Gamboa complex and the clade II to the Alajuela complex. The strain Be AN 439546 presented tropism for chickens lung and liver, with viral replication in this organs confirmed by detection of viral antigens by immunohistochemistry. These results, demonstrate that this bird species is a susceptible host for GAMV replication. The detection of HI antibodies against GAMV, confirmed by neutralization tests were found in wild bird plasmas and reinforces the hypothesis that these animals constitute the main amplification hosts in the maintenance cycle of GAMV. Full length genome studies of the Gamboa serogroup viruses, as well as on the ecoepidemiology of their vectors and potential vertebrate hosts are needed to generate new data and to reinforce the understanding of the information already existent on those viruses.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA BUNYAVIRIDAE

1.1.1 Características Gerais

A família *Bunyaviridae* foi estabelecida no ano de 1975 para compreender uma ampla variedade de vírus que compartilhavam propriedades morfológicas e antigênicas em comum, de forma que, nos dias atuais, representa uma das maiores famílias de vírus conhecidas. A família possui mais de 300 vírus distribuídos em cinco gêneros (*Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*) e mais de 40 vírus que permanecem não classificados. Os quatro primeiros gêneros possuem vírus que, em geral, infectam animais e o último gênero contém vírus conhecidos por infectarem mais de 650 espécies de plantas. Devido a essa ampla variedade de vírus, os bunyavirus apresentam uma considerável diversidade de comportamento biológico, codificação genética e estratégia de replicação (Karabatsos, 1985, Gonzales-Scarano & Nathanson, 1996; Elliott, 2008).

Biológica e epidemiologicamente, os vírus da família *Bunyaviridae* compartilham uma ampla variedade de características, sendo a maioria deles caracterizados como arbovírus, uma vez que mantêm seus ciclos de vida envolvendo artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados suscetíveis. São transmitidos através da picada de artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos, carrapatos e flebotomíneos, sendo que nestes insetos hematófagos

os vírus se replicam aparentemente sem causarem danos evidentes, mantendo uma infecção persistente, não letal e provavelmente por toda a vida. Os hospedeiros vertebrados representados, principalmente, por animais silvestres (roedores, mamíferos, marsupiais e aves), são utilizados pelos vírus para a sua manutenção e persistência em natureza, sendo que a infecção nesses animais é comumente aguda com um breve período de viremia. Em geral, a infecção em humanos é acidental e ocorre quando as pessoas se expõem ao contato com transmissores infectados dos vírus (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljoh & Nichol, 2007).

Existem exceções a essas características, pois os hantavírus não são considerados arbovírus, sendo transmitidos aos humanos mediante inalação de excreta aerolizada de roedores infectados. Cada hantavírus mantém seu ciclo de vida em uma única espécie de roedor hospedeiro, sendo que nesses animais, os hantavírus causam uma infecção persistente assintomática. Já os tospovirus são transmitidos através de tripes (espécie de piolho) entre plantas, sendo capazes de se replicar tanto no inseto como nas plantas (Bishop & Shope, 1979; Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Nichol, *et al.*, 2005; Elliott, 2008).

Alguns membros da família *Bunyaviridae* estão associados com infecções severas e/ou fatais em humanos, com a sintomatologia variando entre casos febris, encefalites, febres hemorrágicas e síndromes respiratórias e renais fatais. Outros bunyavírus são conhecidos por infectarem animais e plantas, causando sérios danos à economia mundial (Quadro 1). Existem ainda muitos outros vírus da família *Bunyarividae* que se desconhece até o momento

associação com doença ou mesmo infecção em humanos. (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Elliott, 1997; Schamoljohn & Patterson, 2001; Elliott, 2008).

Quadro 1 – Principais vírus da família *Bunyaviridae* que causam doença em humanos, outros vertebrados e plantas.

GENERO/VÍRUS	DOENÇA	VETOR	DISTRIBUIÇÃO
<i>Orthobunyavirus</i>			
<i>Akabane</i>	Aborto e defeito congênito em gado	Culicídeos	África, Ásia, Austrália
<i>Cache Valley</i>	Defeito congênito em gado e ovelha	Mosquito	América do Norte
<i>La Crosse</i>	Encefalite em humanos	Mosquito	América do Norte
<i>Oropouche</i>	Doença febril em humanos	Culicídeos	América do Sul
<i>Tahyna</i>	Doença febril em humanos	Mosquito	Europa
<i>Tacaiuma</i>	Doença febril em humanos	Mosquito	América do Sul
<i>Guaroa</i>	Doença febril em humanos	Mosquito	América do Sul
<i>Caraparu</i>	Doença febril em humanos	Mosquito	América do Sul
<i>Catu</i>	Doença febril em humanos	Mosquito	América do Sul
<i>Hantavirus</i>			
<i>Hantaan</i>	Febre hemorrágica severa com síndrome renal em humanos (Mortalidade: 5 a 15%)	Camundongo do campo	Europa Oriental e Ásia
<i>Seoul</i>	Febre hemorrágica moderada com síndrome renal em humanos (Mortalidade: 1%)	Rato sinantrópico	Mundialmente
<i>Puumala</i>	Febre hemorrágica moderada com síndrome renal em humanos (Mortalidade: 0,1%)	Rato silvestre	Europa Ocidental
<i>Sin Nombre</i>	Síndrome cardiopulmonar em humanos (Mortalidade: 50%)	Rato silvestre	América do Norte
<i>Andes</i>	Síndrome cardiopulmonar em humanos	Rato silvestre	América do Sul
<i>Laguna negra</i>	Síndrome cardiopulmonar em humanos	Rato silvestre	América do Sul
<i>Nairovirus</i>			
<i>Crimean-Congo</i>	Febre hemorrágica em humanos (Mortalidade: 20 a 80%)	Carrapatos e Culicídeos	Europa Oriental, África, Ásia
<i>Nairobi</i>	Febre, gastroenterite e aborto em ovelhas e cabras	Carrapatos, Culicídeos e Mosquitos	África e Ásia

Quadro 1 – Principais vírus da família *Bunyaviridae* que causam doença em humanos, outros vertebrados e plantas.

(Continuação)

GENERO/VÍRUS	DOENÇA	VETOR	DISTRIBUIÇÃO
<i>Phlebovirus</i>			
<i>Rift Valley fever</i>	Encefalite e febre hemorrágica em humanos (Mortalidade: 1 a 10%). Hepatite necrótica, hemorragia e aborto em ruminantes domésticos	Mosquitos Flebotomíneos	África
<i>Sandfly fever</i>	Doença febril em humanos	Flebotomíneos	Europa e África
<i>Tospovirus</i>			
<i>Tomato-spotted wilt</i>	Vários sintomas em mais de 650 espécies de plantas	Tripes (piolho)	Mundialmente

Fonte: Adaptado de Elliot, 2008

1.1.2 Estrutura viral

1.1.2.1 Morfologia e organização estrutural

Os integrantes da família *Bunyaviridae* possuem morfologia esférica ou pleomórfica, com 80 a 120 nm de diâmetro. Os bunyavírus possuem quatro proteínas estruturais, sendo duas internas (N e L) e duas glicoproteínas externas, chamadas Gn e Gc, as quais estão inseridas em um envelope lipídico. As proteínas N (\pm 2.100 cópias por vírus) e L (25 cópias por vírus) encontram-se associadas aos segmentos genômicos de RNA, formando o ribonucleocapsídeo (RNC) ou nucleocapsídeo (Figura 1) (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007; Elliott, 2008). Os bunyavírus não codificam proteínas de matriz, as quais possuem a função de estabilizar a estrutura interna das partículas virais. Acredita-se que a

interação entre o nucleocapsídeo e os domínios citoplasmáticos das glicoproteínas inseridas na membrana viral seja importante para a estabilização da estrutura viral (Elliott, 1990; 2008).

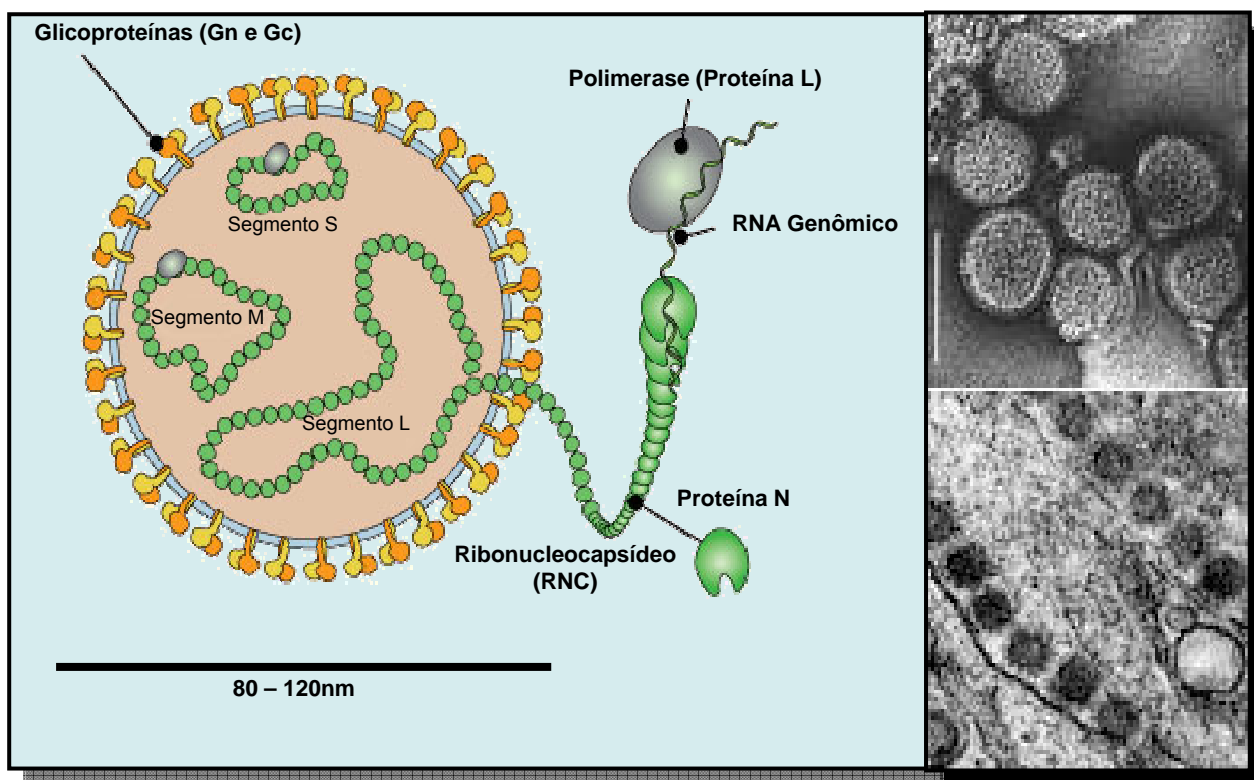


Figura 1 – Esquema da organização estrutural e morfologia dos integrantes da família *Bunyaviridae*.

Fonte: Adaptado de www.expasy.org/viralzone/all_by_protein/82.html;
www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_bunya.htm

1.1.2.2 Propriedades bioquímicas e biofísicas

Os integrantes da família *Bunyaviridae* possuem como propriedades bioquímicas e biofísicas um conteúdo de 2 % de RNA, 58 % de proteínas, 33 % de lipídeos e 7 % de carboidratos; o coeficiente de sedimentação varia de 400 a 500 S e sua densidade de flutuação em gradiente de sucrose é de 1,16 a 1,18 g/cm³ e em gradiente de CsCl é de 1,20 a 1,21 g/cm³. O tratamento do vírus com solventes lipídicos ou detergentes não iônicos removem o envelope viral, resultando na perda da capacidade de infecção das partículas virais (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Schmaljohn & Nichol, 2007).

1.1.3 Estrutura e Organização Genética

1.1.3.1 Genoma Viral

Os bunyavírus possuem o material genético constituído por três segmentos de RNA fita simples sentido negativo ou ambisense, designados de L (*large*), M (*medium*) e S (*small*). Todos os três segmentos genômicos possuem uma sequência nucleotídica complementar nos terminais 5' e 3', sendo altamente conservados entre vírus de um mesmo gênero, porém diferentes entre vírus de gêneros distintos (Quadro 2). Esta complementariedade nucleotídica permite que ocorra o pareamento de base das duas extremidades terminais formando estruturas de RNA circulares e/ou do tipo *panhandle*, as quais são observadas por microscopia eletrônica (Bishop *et al.*, 1980; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007).

Quadro 2 – Sequência nucleotídica dos terminais 5' e 3' dos genes S, M e L de representantes da família *Bunyaviridae*.

GÊNERO/VÍRUS	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	TAMANHO DO GENE Pares de bases - (GenBank)		
		Segmento S	Segmento M	Segmento L
<i>Orthobunyavirus/ Vírus Bunyamwera</i>	3' UCAUCACAUG- 5' AGUAGUGUGC-	961 (D00353)	4458 (M11852)	6875 (X14383)
<i>Hantavirus/ Vírus Hantaan</i>	3' AUCAUCAUCUG- 5' UAGUAGUAUGC-	1696 (M14626)	3616 (M14627)	6533 (X55901)
<i>Nairovirus/ Vírus Dugbe</i>	3' AGAGUUUCU- 5' UCUCAAAGA-	1712 (M25150)	4888 (M94133)	12255 (U15018)
<i>Phlebovirus/ Vírus Rift Valley</i>	3' UGUGUUUC- 5' ACACAAAG-	1690 (X53771)	3885 (M11157)	6404 (X56464)
<i>Tospovirus/ Vírus Tamato spotted wilt</i>	3' UCUCGUUA- 5' AGAGCAAU-	2916 (D00645)	4821 (S48091)	8897 (D10066)

Fonte: Schmaljohn & Nichol, 2007

1.1.3.2 Estratégia de Codificação do Genoma Viral

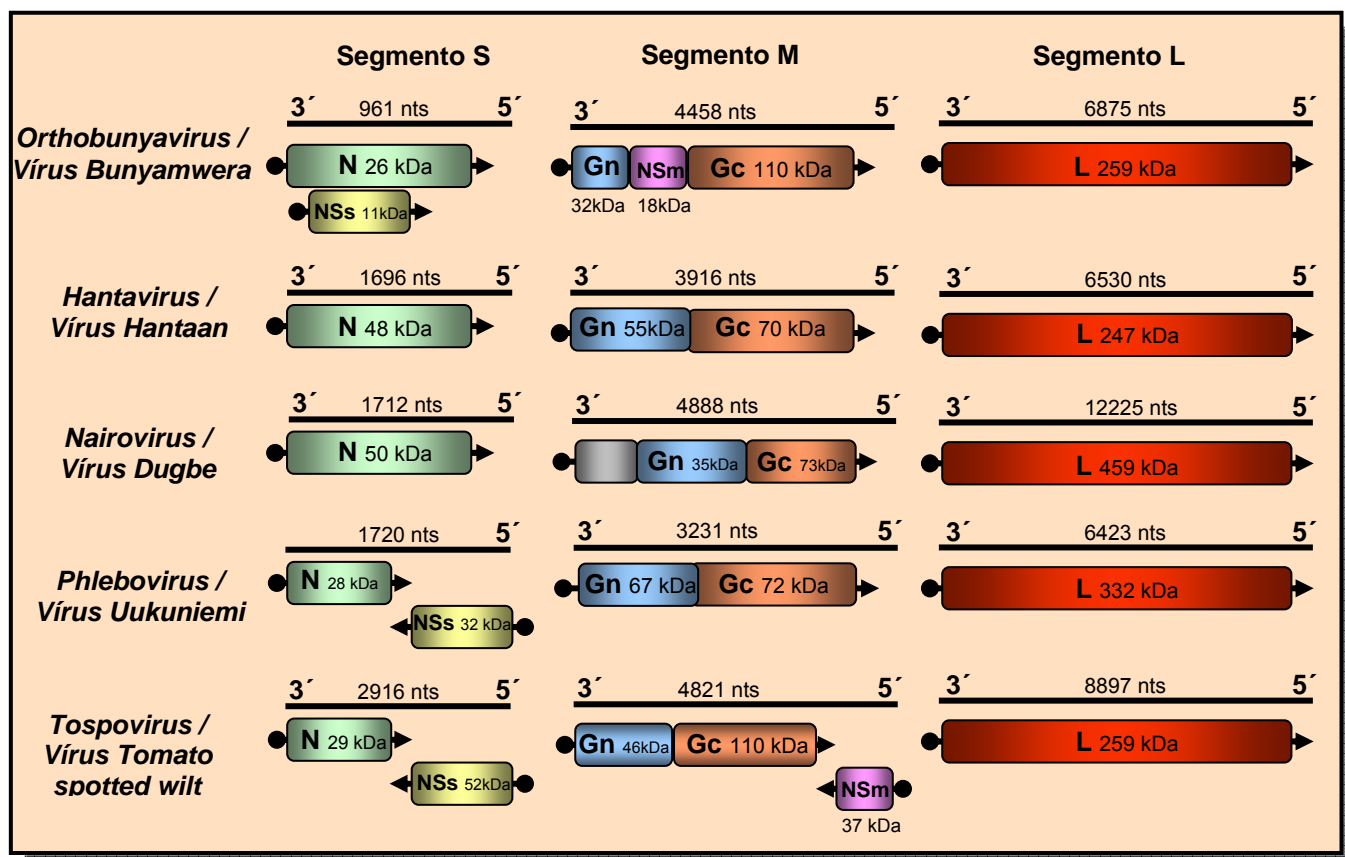
O segmento L dos bunyavírus codifica uma proteína com atividade de RNA polimerase dependente de RNA (proteína L), que realiza a replicação e transcrição dos segmentos genômicos de RNA dos vírus. Todos os bunyavírus usam como estratégia de codificação do segmento L o sentido negativo, ou seja, um RNA mensageiro (RNAm) complementar sentido positivo é necessário para a replicação do RNA viral (Figura 2). O tamanho do segmento L dos orthobunyavírus, hantavírus e phlebovírus é similar (aproximadamente 6.500 nucleotídeos), enquanto que dos nairovírus e tospovírus é maior, com cerca de 12.000 e 9.000 nucleotídeos, respectivamente (Schmaljohn, 1996; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007; Elliott, 2008).

O segmento M codifica no RNAm complementar senso um precursor polipeptídico que dá origem, após clivagem co-traducional do produto primário do gene (com exceção para os nairovírus), às glicoproteínas de superfície Gn e Gc (Schmaljoh, 1996; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljoh & Nichol, 2007; Elliott, 2008). Essas proteínas estão associadas a vários atributos biológicos dos vírus, tais como a atividade da hemaglutinina (hemaglutinação de hemácias de ganso), virulência, tropismo celular, neutralização e fusão celular (Schmaljoh, 1996; Elliott, 2008).

O segmento M dos vírus do gênero *Orthobunyavirus* codifica ainda uma proteína não estrutural chamada NSm, em uma região do gene localizada entre as glicoproteínas Gn e Gc, enquanto alguns phlebovírus codificam esta proteína numa região codificadora anterior a das glicoproteínas, com exceção para o *Vírus Uukuniemi* (VUUK) que não codifica esta proteína. Os tospovírus também codificam a proteína NSm, porém usando como estratégia de replicação o sentido ambisenso (Figura 2) (Schmaljoh & Nichol, 2007; Elliott, 2008).

Por sua vez, o segmento S codifica uma proteína do nucleocapsídeo (N) e para os vírus dos gêneros *Orthobunyavirus* (com exceção de seis vírus dos grupos Anopheles A, Anopheles B e Tete), *Phlebovirus* e *Tospovirus* codificam ainda uma proteína não estrutural NSs. Para os orthobunyavírus as duas proteínas são traduzidas a partir do mesmo RNAm, sendo que cada proteína possui um códon alternativo de inicialização. Já os hantavírus e nairovírus codificam a proteína N a partir de uma única matriz de leitura aberta (*Open Reading Frame* – ORF) encontrada no segmento S de RNA

complementar senso. Os phlebovírus e tospovírus codificam as proteínas N usando como estratégia de replicação o sentido ambisenso (Figura 2) (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Schmaljohn & Patterson, 2001; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljohn & Nichol, 2007; Elliott, 2008).



Fonte: Adaptado de Elliott, 2008.

Figura 2 – Organização e estratégia de codificação dos segmentos genômicos dos integrantes da família *Bunyaviridae*. Os RNAs genômicos estão representados por linhas e os produtos dos segmentos genômicos por retângulos sólidos.

1.1.4 Ciclo de Replicação Viral

Todos os estágios da replicação viral dos integrantes da família *Bunyaviridae* ocorrem no citoplasma da célula hospedeira (Nichol *et al.*, 2005). Inicialmente, ocorre a ligação das glicoproteínas virais Gn e/ou Gc com receptores de superfície presentes na célula hospedeira, sendo que para a maioria dos bunyavírus ainda não se conhece o tipo de receptor celular usado nesta etapa da replicação viral. Após a ligação do vírus com a célula hospedeira, ocorre a entrada das partículas virais no citoplasma da célula, através de processo de endocitose. Acredita-se que a acidificação da vesícula endossomal promova a mudança conformacional em Gn e/ou Gc, o que permite a fusão das membranas endossomal e viral e a consequente liberação do material genético do vírus no citoplasma da célula (Schmaljoh, 1996; Nichol *et al.*, 2005; Schmaljoh & Nichol, 2007; Elliott, 2008).

Após a liberação do material genético no citoplasma celular, o genoma sofre, inicialmente, uma transcrição primária pela proteína L do vírus, dando origem ao RNAm complementar, sendo que a tradução dos RNAm dos segmentos S e L é realizada pelos ribossomos livres no citoplasma, enquanto o do segmento M por ribossomos ligados a membranas. Em seguida, o genoma é replicado para um RNA complementar sentido positivo, chamado de RNA antígenoma. Esta molécula difere do RNAm sentido positivo, pois não possui a sequência iniciadora no terminal 5', e o terminal 3' se estende para o 5' no RNA molde (Schmaljoh & Nichol, 2007; Elliott, 2008).

Após a tradução das proteínas e replicação dos segmentos de RNA, ocorre a glicosilação primária das proteínas do envelope viral no complexo de Golgi e a montagem das partículas virais, as quais são transportadas por vesículas do complexo de Golgi e liberadas por exocitose. Tem-se observado que para alguns vírus a montagem das partículas virais ocorre na membrana da célula hospedeira (Schmaljoh, 1996; Nichol, *et al.*, 2005; Schmaljoh & Nichol, 2007; Elliott, 2008). Na Figura 3 está representado um esquema simplificado do ciclo de replicação dos vírus da família *Bunyaviridae*.

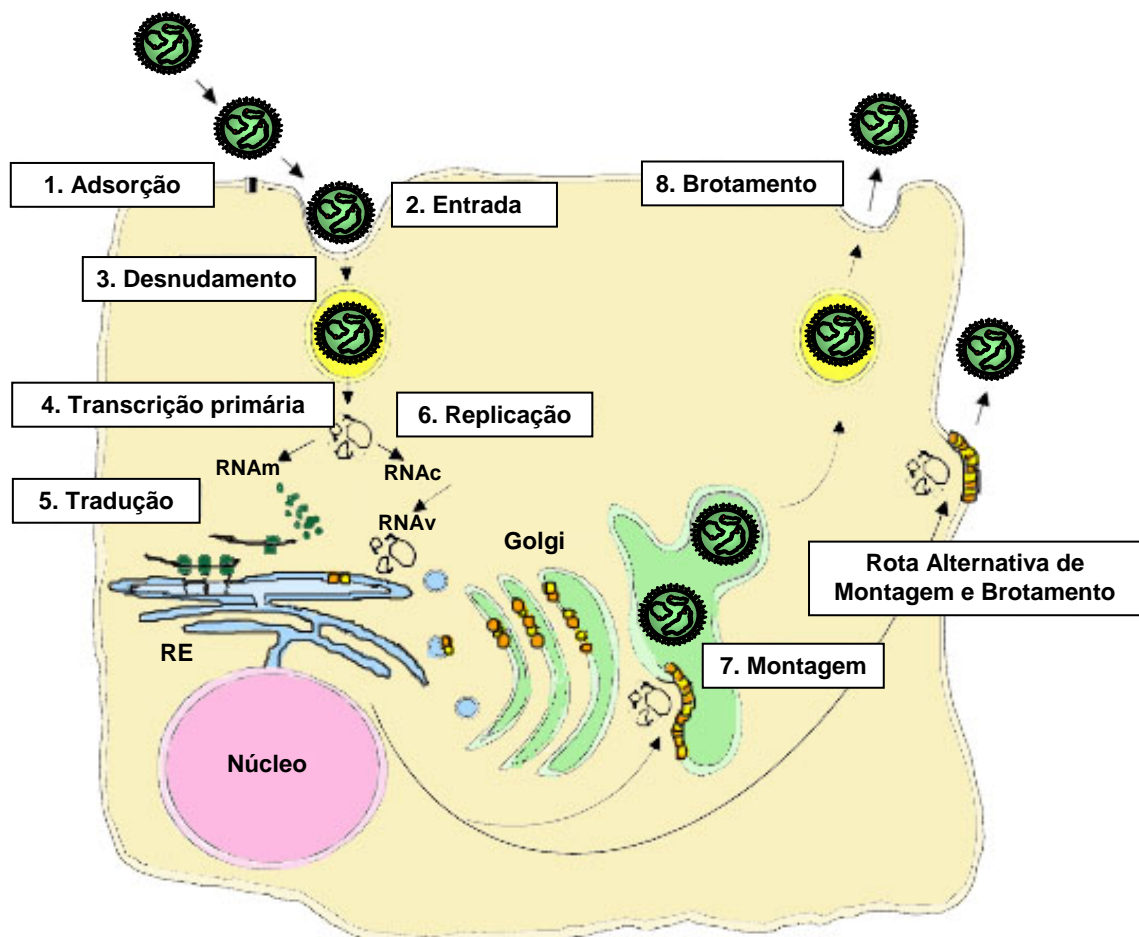


Figura 3 – Esquema do ciclo de replicação dos vírus da família *Bunyaviridae*.

(Fonte: Adaptado de Schmaljoh & Nichol, 2007).

1.1.5 Classificação e Taxonomia Viral

No passado, a classificação dos integrantes da família *Bunyaviridae* era realizada mediante cruzamento antigênico em testes sorológicos clássicos, como testes de neutralização (TN), inibição da hemaglutinação (IH) e fixação do complemento (FC) (Casals, 1957; Beaty & Bishop, 1988). Porém, atualmente, as características moleculares do genoma e proteínas virais vêm sendo utilizadas para uma classificação mais eficiente, com base nas características bioquímicas e moleculares desses vírus (Gonzales-Scarano & Nathanson, 1996; Elliott, 2008).

Os bunyavírus são classificados dentro de um gênero viral através de reatividade cruzada usando testes sorológicos de FC, o qual detecta a relação entre as proteínas N dos vírus. Já os testes de IH e TN têm sido utilizados para distribuir os vírus dentro de sorogrupos, utilizando a relação entre as glicoproteínas dos vírus (Beaty & Bishop, 1988; Elliott, 1990; Calisher, 1996). Devido à relação antigênica entre o *Vírus Bunyamwera* (VBUN) e outros vírus desse grupo, Casals e Whitman (1960) e Whitman e Shope (1962) sugeriram agrupar esses vírus dentro de um supergrupo chamado de Bunyamwera, o qual foi posteriormente mudado para gênero *Bunyavirus*, devido as similaridades moleculares, morfogenéticas, estruturais e modo de replicação dos integrantes virais desse gênero (Bishop *et al.*, 1980). Mais recentemente, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV) decidiu renomear esse gênero para *Orthobunyavirus* (Elliott *et al.*, 2000).

1.2 GÊNERO ORTHOBUNYAVIRUS

O gênero *Orthobunyavirus* contém mais de 150 vírus distribuídos em 18 grupos antigênicos (Quadro 3) (Gonzalez-Scarano & Nathanson, 1996; Schmaljoh & Nichol, 2007).

Quadro 3 – Principais integrantes virais do gênero *Orthobunyavirus*.

SOROGRUPO	VÍRUS	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	DOENÇA
Anopheles A	<i>Tacaiuma</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Virgin River</i>	América do Norte	Sem Registro
Anopheles B	<i>Anopheles B</i>	América do Sul	Sem Registro
Bakau	<i>Bakau</i>	Ásia	Sem Registro
Bunyamwera	<i>Bunyamwera</i>	África	Humanos
	<i>Cache Valley</i>	América do Norte	Ovelhas, gado e humanos
	<i>Fort Sherman</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Germiston</i>	África	Humanos
	<i>Ilesha</i>	África	Humanos
	<i>Kairi</i>	América do Sul	Cavalos
	<i>Main drain</i>	América do Norte	Cavalos
	<i>Shokwe</i>	África	Humanos
	<i>Wyeomyia</i>	América do Sul	Humanos
Bwamba	<i>Xingu</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Bwamba</i>	África	Humanos
C	<i>Pongola</i>	África	Humanos
	<i>Apeu</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Caraparu</i>	Américas do Sul e Norte	Humanos
	<i>Itaqui</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Madrid</i>	América do Norte	Humanos
	<i>Marituba</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Murucutu</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Nepuyo</i>	Américas do Sul e Norte	Humanos
	<i>Oriboca</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Ossa</i>	América do Norte	Humanos
<i>Restan</i>	América do Sul	Humanos	

Quadro 3 – Principais integrantes virais do gênero *Orthobunyavirus*.

(Continuação)

SOROGRUPO	VÍRUS	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	DOENÇA
Califórnia	<i>Encefalite California</i>	América do Norte	Humanos
	<i>Guaroa</i>	Américas do Sul e Norte	Humanos
	<i>Inkoo</i>	Europa	Humanos
	<i>Jamestown Canyon</i>	América do Norte	Humanos
	<i>La crosse</i>	América do Norte	Humanos
	<i>Snowshoe hare</i>	América do Norte	Humanos
	<i>Tahyna (Lumbo)</i>	Europa (África)	Humanos
Capim	<i>Capim</i>	América do Sul	Sem Registro
Gamboa	<i>Gamboa</i>	Desconhecido	Sem Registro
Guama	<i>Catu</i>	América do Sul	Humanos
	<i>Guama</i>	Américas do Sul e Norte	Humanos
Koongol	<i>Koongol</i>	Austrália	Sem Registro
Minatitlan	<i>Minatitlan</i>	América do Norte	Sem Registro
Nyando	<i>Nyando</i>	África	Humanos
Olifantsvlei	<i>Olifantsvlei</i>	África	Sem Registro
Patois	<i>Patois</i>	América do Norte	Sem Registro
	<i>Esterio Real</i>	América do Norte	Sem Registro
Simbu	<i>Akabane</i>	África, Ásia e Austrália	Gado
	<i>Ingwavuma</i>	África e Ásia	Porcos
	<i>Oropouche</i>	América do Sul	Humanos
Tetê	<i>Bahig</i>	África, Europa	Sem Registro
	<i>Weldona</i>	América do Norte	Sem Registro
Turlock	<i>Turlock</i>	Américas do Norte e Sul	Sem Registro

Fonte: Schmaljohh & Nichol, 2007

1.2.1 Genoma e Proteínas dos Orthobunyavírus

1.2.1.1 Segmento L – Proteína L

De acordo com dados publicados de sequências nucleotídicas completas do segmento L de vírus dos grupos antigênicos Bunyamwera, Califórnia e Simbu, esse segmento de RNA possui em torno de 6,8 a 6,9 kilobases (Kb). No RNA viral complementar existe um único códon AUG-

iniciando a ORF que codifica uma proteína de 2238 aminoácidos, chamada de proteína L. Até o momento, não se têm evidências de outras regiões codificantes neste segmento, além disso, possui menos de 200 nucleotídeos que resultam em informação não codificante (Elliott, 1990; Schmaljoh & Nichol, 2007).

Estudos com RNAm sintetizados por proteínas L recombinantes, revelaram que estas moléculas de RNA possuem um cap 5', além de sequências iniciadoras derivadas do hospedeiro, as quais são necessárias para a transcrição, sugerindo, desta forma, que a proteína L tem uma atividade de endonuclease que media o processo de *cap-snatching* (Jin & Elliott, 1993). De uma forma geral, pouca homologia é observada entre as proteínas L dos vírus dos diferentes gêneros. Porém, alinhamento de sequências de aminoácidos da proteína L do *Vírus La Crosse* (VLAC) com sequências de outras polimerases de outros vírus da família *Bunyaviridae*, tem identificado a presença de motivos conservados contendo um módulo de polimerase comum para todas as polimerases dependentes de RNA (Roberts *et al.*, 1995). Vários estudos têm demonstrado que a proteína L de vírus do sorogrupo Califórnia também possui a função de atenuar a neurovirulência e a neuroinvasão, porém este mecanismo ainda permanece pouco estudado (Rozhon *et al.*, 1981; Endres *et al.*, 1991).

1.2.1.2 Segmento M – Glicoproteínas Gn / Gc e Proteína NSm

O segmento M dos orthobunyavirus possui em torno de 4.458 a 4.534 nucleotídeos e a ORF contém 1.433 a 1.441 códons (Eshita & Bishop, 1984; Lees *et al.*, 1986; Grandy *et al.*, 1987; Pardigon *et al.*, 1988; Campbell & Hung, 1999; Yanase *et al.*, 2003) que codificam três proteínas, sendo duas glicoproteínas de superfície: Gn (29 a 41 kilodalton – kDa) e Gc (108 a 125 kDa), e uma proteína não estrutural NSm (15 – 18 kDa), na forma de um precursor polipeptídico, o qual é provavelmente clivado co-traducionalmente para dar origem às proteínas “maduras” (Lees *et al.*, 1986; Elliott, 1990; Nichol *et al.*, 2005). Vírus de sorogrupos diferentes apresentam, para o segmento M, uma pequena sequência homóloga, enquanto os vírus de um mesmo sorogrupo mostram uma similaridade mais próxima entre si, com cerca de 66 % para Gn, 40 % para Gc e 50 % para NSm (Pringle, 1991).

Estudos de alinhamento de sequências nucleotídicas do segmento M de vírus dos sorogrupos Bunyamwera e Califórnia identificaram três sítios de glicosilação em potencial (que são relativamente ricos em resíduos de cisteína e em domínios hidrofóbicos terminais N e C), que são conservados nas proteínas Gn e Gc desses vírus (Lees *et al.*, 1986; Pardigon *et al.*, 1988). Entretanto, para o *Vírus Oropouche* (VORO) foi encontrado apenas dois sítios de glicosilação, os quais apenas na proteína Gc é conservado (Wang *et al.*, 2001). Acredita-se que estas regiões conservadas estão envolvidas com epítomos de neutralização e proteção (Wang *et al.*, 1993). Já Cheng e colaboradores (2000), demonstraram que a região conservada da glicoproteína

Gn possui determinantes antigênicos tipo-específicos para anticorpos hemaglutinantes e neutralizantes, os quais são usados para classificar os vírus dentro dos sorogrupos. Para a glicoproteína Gc, acredita-se que ela seja o principal determinante para a realização da etapa de adsorção durante o ciclo de replicação dos vírus nas células de mamíferos, assim como estaria envolvida no processo de fusão do envelope viral com a membrana celular (Pobjechy *et al.*, 1986; Pekosz *et al.*, 1995). Além dessas funções, esta glicoproteína também parece estar envolvida na determinação da virulência (Gonzalez-Scarano, *et al.*, 1985; Elliott, 1990).

Estudos demonstraram que a proteína não estrutural NSm é uma proteína integral de membrana que está localizada no complexo de Golgi, fato este que tem levado os pesquisadores a sugerirem que a NSm pode estar envolvida no processo de montagem e morfogênese das partículas virais (Shi *et al.*, 2006). Para a realização desses processos, acredita-se que três domínios hidrofóbicos e dois não-hidrofóbicos presentes na proteína NSm, podem ser utilizados. Esses domínios podem ainda atuar como uma sequência de sinal interno para a atuação da glicoproteína Gc (Shi *et al.*, 2006). Tem sido também demonstrado que o domínio N terminal da proteína NSm é requerido para a multiplicação do vírus em culturas de células infectadas (Pollit *et al.*, 2006)

1.2.1.3 Segmento S – Proteínas N e NSs

Estudos das sequências nucleotídicas do segmento S de vírus do gênero *Orthobunyavirus* determinaram um comprimento de 754 a 1021 pares de bases. Para a proteína N, tem sido demonstrado que a sequência nucleotídica de vírus de um mesmo sorogrupo apresenta 80 % de similaridade, caindo para 40 % para vírus de sorogrupos diferentes (Elliott, 1990). O alinhamento de sequências nucleotídicas e de aminoácidos de vírus dos grupos antigênicos Bunyamwera, Califórnia e Simbu, revelou a presença de algumas regiões conservadas na proteína N, as quais têm sido sugeridas estarem associadas com anticorpos fixadores de complemento e reação cruzada entre vírus dentro de um mesmo sorogrupo (Akashi *et al.*, 1984; Dunn *et al.*, 1994; Bowen *et al.*, 1995; Saeed *et al.*, 2001). Outro estudo com o VBUN demonstrou que a proteína N se liga especificamente ao terminal 5' do segmento S, o qual deve possuir o sinal para a proteína N iniciar a encapsidação do genoma viral (Osborne & Elliott, 2000).

A proteína não estrutural NSs dos orthobunyavírus possui entre dez a 13 kDa e é traduzida a partir do mesmo RNAm, usando códons iniciadores AUG- alternativos na ORF (Akashi & Bishop, 1983; Elliott, 2008). Não existem sequências conservadas na NSs de vírus de diferentes gêneros, entretanto algumas sequências idênticas foram observadas entre vírus de um mesmo gênero (Dunn *et al.*, 1994). A proteína NSs não participa do processo de replicação, embora seja considerada um fator acessório de virulência (Elliott, 2009).

Estudos têm demonstrado que a proteína NSs parece atuar como um antagonista da resposta do interferon (IFN) do hospedeiro (Elliott, 2009). Weber e colaboradores (2002) demonstraram essa característica em estudos com o VBUN, onde a proteína NSs bloqueava a ativação da transcrição de IFN- β , contribuindo, desta forma, com a patogênese do vírus. Bridgen e colaboradores (2001) e Kohl e colaboradores (2003), demonstraram que esta proteína também é capaz de inibir a síntese das proteínas da célula hospedeira e retardar o estágio inicial de morte celular, inibindo o processo de apoptose mediado por IRF-3. Em um recente trabalho, Mohamed e colaboradores (2009) demonstraram que seis vírus dos sorogrupos Anopheles A, Anopheles B e Tete não codificam a proteína NSs, devido à presença de vários códons de parada ao longo da ORF desses vírus.

1.2.2 Transmissão dos Orthobunyavírus

Quase todos os membros desse gênero são transmitidos por mosquitos (uma minoria por carrapatos e culicídeos) e utilizam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados para a amplificação de seus ciclos de manutenção. As transmissões transovariana e venérea têm sido registradas para alguns orthobunyavírus, tais como o VLAC e *Vírus Gamboa* (VGAM) (Thompson & Beaty, 1977; Bishop *et al.*, 1980; Dutary *et al.*, 1989). Esses dois modos de transmissão são importantes e essenciais, uma vez que asseguram a sobrevivência dos vírus, principalmente durante condições adversas do tempo (Beaty & Bishop, 1988; Elliott, 2009).

Em geral, os ciclos de transmissão dos orthobunyavírus não são complexos e apresentam uma notável estabilidade em sua manutenção e transmissão, utilizando, em geral, apenas uma espécie de vetor artrópode, tal como observado para os VLAC, *Vírus Snowshoe hare* (VSSH) e *Vírus Trivittatus* (VTVT) que utilizam, respectivamente, como vetores, os mosquitos *Aedes triseriatus*, *Aedes communis* e *Aedes trivittatus*. Uma exceção a essa característica dos orthobunyavírus é o *Vírus Rift Valley* (VRFV), que tem sido isolado de mais de 40 espécies de mosquitos de diferentes gêneros, assim como de flebotomíneos (Elliott, 2009).

1.2.3 Epidemiologia dos Orthobunyavirus

1.2.3.1 Grupo Antigênico Anopheles A

Os vírus do sorogrupo Anopheles A são comumente isolados de vários mosquitos, especialmente anofelinos e culicineos, tanto na América do Sul quanto na América do Norte. Dados obtidos de inquéritos sorológicos demonstraram que alguns vírus desse grupo antigênico causam infecção natural em animais domésticos e selvagens, tais como gado, porcos, cavalos, aves silvestres, roedores e morcegos (Bishop, 1996). O *Vírus Tacaiuma* (VTCM) é mantido em natureza através de um ciclo que envolve mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Anopheles* como principais vetores, e diversos grupos de animais, especialmente macacos, como hospedeiros vertebrados. O VTCM foi isolado até o momento apenas na Amazônia e no Estado de São Paulo,

embora imunidade para esse vírus tenha sido registrada na Guiana Francesa e Argentina. Casos esporádicos e isolados de infecção pelo VTCM em humanos têm sido relatados, sendo a doença caracterizada por uma síndrome febril, acompanhada por cefaléia, calafrios, mialgias e astenia, que dura em torno de três dias de evolução, culminando com a completa recuperação do paciente (Vasconcelos *et al.*, 1992; 1998; Travassos da Rosa, *et al.*, 1997).

1.2.3.2 Grupo Antigênico Califórnia

Os vírus desse grupo são todos transmitidos por mosquitos e possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados nas Américas do Sul e do Norte, Ásia, Europa e África (Calisher, 1983). Muitos vírus desse sorogrupo estão associados com infecções em humanos causando, principalmente, casos de encefalites, tais como os *Vírus da Encefalite Califórnia* (VEC), *Vírus Jamestown Canyon* (VJC), *Vírus Inkoo* (VINK), VLAC, VSSH e VTVT. Juntos, esses vírus são responsáveis por causar aproximadamente 60 a 130 casos de encefalite por ano nos Estados Unidos (Schmaljoh & Nichol, 2007). A infecção em humanos pelo VLAC raramente é fatal (< 1 %), embora a doença aguda seja severa e alguns pacientes apresentem ataques epiléticos, cerca de 10 % deles tornam-se crônicos (Elliott, 1997).

O *Vírus Tahyna* (VTAH) foi isolado de um lote de mosquitos *Aedes caspius* em 1958 na Tchecoslováquia e encontra-se amplamente distribuído na Europa central e Ásia. Tem sido associado a uma doença febril indiferenciada

com sintomas parecidos com influenza, podendo ainda estar associado à pneumonia e pleurisia, artrite aguda, faringite e ocasionalmente envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Anticorpos específicos para o VTAH têm sido detectados com alta prevalência em humanos, aves e mamíferos (Elliott, 1997; Gratz, 2006; Lu *et al.*, 2009).

No Brasil, observa-se a ocorrência do *Vírus Guaroa* (VGRO) infectando o homem. Esse vírus causa uma doença febril de evolução autolimitada, com quadro clínico caracterizado por febre elevada (39 ° a 40 °C), cefaléia, calafrios e mialgias. Todos os casos registrados da doença ocorreram em pessoas que viviam em áreas urbanas com intenso contato com a floresta. A prevalência de anticorpos para o VGRO varia de 8 a 18 % na população da Amazônia brasileira, sendo mais elevada, principalmente, naqueles que vivem às proximidades das florestas (Vasconcelos *et al.*, 1992; 1998; Travassos da Rosa, *et al.*, 1997).

1.2.3.3 Grupo Antigênico Bunyamwera

O VBUN, protótipo da família *Bunyaviridae* e do gênero *Orthobunyavirus*, causa uma doença febril aguda com dor de cabeça, artralgia e exantema em humanos registrada na região do Sub-Saara africano. Uma grande percentagem (> 82 %) de anticorpos para o VBUN foi detectada na população dessa área africana, demonstrando a ampla circulação desse vírus naquele continente (Nichol, 2001; Schmaljoh & Nichol, 2007). Recentemente, o *Vírus Ngari* (originado a partir de um rearranjo genético entre os VBUN e

Vírus Batai – VBAT) foi associado com casos de febre hemorrágica no Quênia e Somália e a grandes epidemias de doença febril aguda no Sudão (Bowen *et al.*, 2001; Schmaljoh & Nichol, 2007). O *Vírus Cache Valley* (VCV) é encontrado nos Estados Unidos, Canadá e México, infectando ovelhas e, possivelmente, ruminantes. Esse vírus é responsável por causar morte fetal, aborto e múltipla má formação em ovelhas, e a partir de um caso fatal de encefalite em humano confirmado pelo VCV, esse vírus desde então tem sido relacionado a casos de encefalite nos Estados Unidos (Sexton *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2006).

No Brasil, o *Vírus Xingu* (VXIG) foi isolado de um paciente febril que desenvolveu uma síndrome ictero-hemorrágica e faleceu. Os exames posteriores mostraram que o paciente também se encontrava infectado com o *Vírus da hepatite B* e desenvolveu hepatite fulminante (Vasconcelos *et al.*, 1992; 1998).

1.2.3.4 Grupo Antigênico Simbu

O sorogrupo Simbu possui mais de 20 vírus, dos quais alguns estão relacionados com doença em humanos. O VORO tem causado significantes epidemias de doença febril, conhecida como febre do Oropouche, acometendo milhares de pessoas, principalmente, na Amazônia brasileira. O quadro clínico é caracterizado por febre acompanhada de cefaléia, mialgias, artralgias e outras manifestações sistêmicas (Pinheiro *et al.*, 1981; Nunes *et al.*, 2007). Fora do Brasil, ocorreram epidemias no Panamá e no Peru (Azevedo *et al.*,

2007). Outros dois vírus, desse grupo antigênico, estão associados com doença em animais, são os *Vírus Akabane* (VAKA) e *Vírus Aino* (VAINO). Tais vírus têm causado aborto e má formação congênita em gado, ovelhas e cabras, encontrando-se amplamente distribuídos no sudeste e oeste da Ásia e na Austrália, causando sério impacto econômico na criação desses rebanhos nessas áreas (Inaba *et al.*, 1975; Schmaljoh & Nichol, 2007).

1.2.3.5 Grupo Antigênico C

Um total de 13 vírus desse grupo antigênico tem sido isolado de humanos e animais silvestres, como roedores, marsupiais e morcegos, bem como de animais sentinelas. Encontram-se distribuídos geograficamente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, incluindo os Estados Unidos, México, Panamá, Honduras, Guatemala, Trinidad, Brasil, Peru, Equador Venezuela e Guiana Francesa (Karabatsos, 1985; Shope *et al.*, 1988). Dos 13 vírus desse grupo, dez [*Vírus Caraparu* (VCAR), *Vírus Oriboca* (VORI), *Vírus Itaqi* (VITQ), *Vírus Nepuyo* (VNEP), *Vírus Apeu* (VAPEU), *Vírus Marituba* (VMTB), *Vírus Murutucu* (VMUR), *Vírus Restan* (VRES), *Vírus Ossa* (VOSSA) e *Vírus Madrid* (VMAD)] estão associados com doença em humanos, com uma sintomatologia parecida com a dengue, onde febre, cefaléia, mialgias, náusea, vômito e fraqueza são os principais sintomas clínicos (Nunes *et al.*, 2005). A maior prevalência de anticorpos na Amazônia brasileira tem sido observada para o VCAR (Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2007).

1.2.3.6 Grupo Antigênico Guamá

Os vírus desse sorogrupo têm sido isolados de aves silvestres, morcegos e uma variedade de animais domésticos (gado, porcos e ovelhas) e animais sentinelas. Os roedores e marsupiais estão associados como hospedeiros para membros do grupo Guamá, assim como diversos mosquitos atuam como vetores. Encontram-se distribuídos geograficamente nas Américas do Sul e do Norte (Karabatsos, 1985; Bishop, 1996). Na Amazônia brasileira observa-se a ocorrência de sete vírus desse grupo, porém apenas dois estão envolvidos com infecções em humanos, os *Vírus Catu* (VCATU) e *Vírus Guama* (VGMA). Esses vírus determinam um quadro de síndrome febril, acompanhado por cefaléia e calafrios que costumam ser intensos, além de mialgias, fotofobia e anorexia. Os sintomas persistem por até cinco dias, evoluindo para a recuperação completa e gerando imunidade específica (Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 1992, 1998).

1.2.3.7 Demais Grupos Antigênicos

Dos demais sorogrupos apenas os Bwamba e Nyando apresentam vírus que estão associados com infecções em humanos. Os vírus desses dois grupos antigênicos são encontrados apenas na África e estão relacionados com casos febris em humanos, a partir dos quais vários isolamentos já foram obtidos. Anticorpos para os vírus do grupo Bwamba têm sido detectados em humanos, animais domésticos e aves (Bishop & Shope, 1979; Karabatsos,

1985). Para os vírus dos dez sorogrupos restantes (Anopheles B, Bakau, Capim, Gamboa, Koongol, Minatitlan, Olifantsvlei, Patois, Tete e Turlock) nenhum isolamento viral a partir de material de humano foi realizado até o momento, não associando, desta forma, esses vírus com infecção em humanos (Karabastos, 1985; Elliott, 2008).

1.3 SOROGRUPO GAMBOA – VÍRUS GAMBOA (VGAM)

O VGAM (Cepa MARU-10962), protótipo do sorogrupo Gamboa, foi isolado pela primeira vez a partir de um lote de 18 fêmeas adultas de mosquitos da espécie *Aedeomyia squamipennis*, coletadas em 20 de dezembro de 1962 na cidade de Gamboa na República do Panamá (Karabatsos, 1985). Posteriormente, quatro isolamentos virais adicionais relacionados ou idênticos ao VGAM foram obtidos a partir de *Aedeomyia squamipennis* no Panamá. Desses isolamentos, a cepa MARU-11079 mostrou ser relacionada, porém não idêntica à cepa protótipo MARU-10962 do VGAM em testes sorológicos de FC, IH e TN (Calisher *et al.*, 1981).

Calisher e colaboradores (1981) em um estudo de coleta de mosquitos realizado no Panamá, Equador e Argentina durante os anos de 1974 a 1978 isolaram 27 cepas virais a partir de *Aedeomyia squamipennis*, sendo que desses isolamentos, três mostraram-se distintos da cepa protótipo do VGAM. Como resultado desse estudo, foi estabelecido o sorogrupo Gamboa compreendendo dois complexos antigênicos (Complexo Gamboa e Complexo Alajuela), cada um com dois sorotipos diferentes, o VGAM e *Vírus Pueblo Viejo*

(VPV) e o *Vírus Alajuela* (VALJ) e *Vírus San Juan* (VSJ), respectivamente. Posteriormente, Calisher e colaboradores (1988), identificaram uma nova cepa viral pertencente ao sorogrupo Gamboa, complexo Alajuela, que apresenta uma relação antigênica mais próxima ao *Vírus Alajuela*, sendo, porém distinto desse. A esse novo vírus os autores chamaram de *Vírus Brus Laguna* (VBL).

A organização esquemática atual do sorogrupo Gamboa com seus dois complexos antigênicos pode ser visualizada na Figura 4 (Calisher, *et. al.*, 1981).

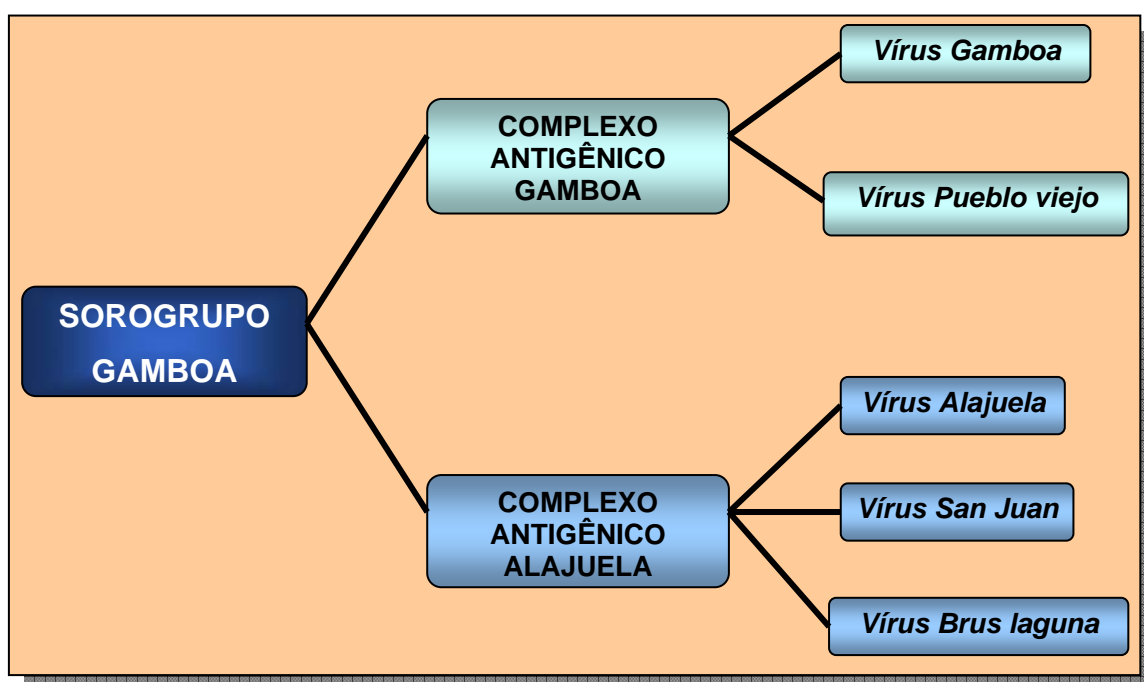


Figura 4 – Organização do sorogrupo Gamboa com seus dois complexos antigênicos.

Fonte: Adaptado de Calisher *et al.*, 1981)

Outros isolamentos de vírus pertencentes ao sorogrupo Gamboa foram realizados em anos subsequentes a partir de mosquitos *Aedeomyia squamipennis*. Mitchell e colaboradores (1985) em um trabalho de investigação de arbovírus na Argentina, realizado nos anos de 1977 a 1980, conseguiram isolar oito cepas virais do sorogrupo Gamboa, todas a partir de lotes de mosquitos *Aedeomyia squamipennis*. No Equador, foram obtidas por Calisher e colaboradores (1983) seis amostras virais identificadas por testes de FC e TN como o VSJ e três como o VPV, todas também isoladas a partir mosquitos da espécie *Aedeomyia squamipennis*.

Em um trabalho de coleta de dados virológicos realizado nos anos de 1985 a 1989, após a conclusão da hidrelétrica de Tucuruí, no estado do Pará, foi obtido o isolamento original no Brasil da cepa BE AN 439546 do VGAM a partir do sangue de uma ave silvestre da espécie *Geotrygon montana*, família Columbidae (Dégallier *et al.*, 1992a; 1992b). Posteriormente, neste mesmo local, foi possível realizar o isolamento de outras 92 cepas virais relacionadas ao sorogrupo Gamboa. No total, 93 cepas de vírus relacionadas ao sorogrupo Gamboa foram isoladas, sendo 90 amostras obtidas a partir de mosquitos *Aedeomyia squamipennis*, duas a partir do sangue de aves silvestres e uma a partir de mosquitos *Anopheles triannulatus* (SAARB – IEC, dados não publicados).

Os isolamentos virais dos membros do grupo antigênico Gamboa obtidos até o momento foram procedentes de países da América Latina, como Argentina, Panamá, Equador, Venezuela, Honduras e Brasil (Figura 5).

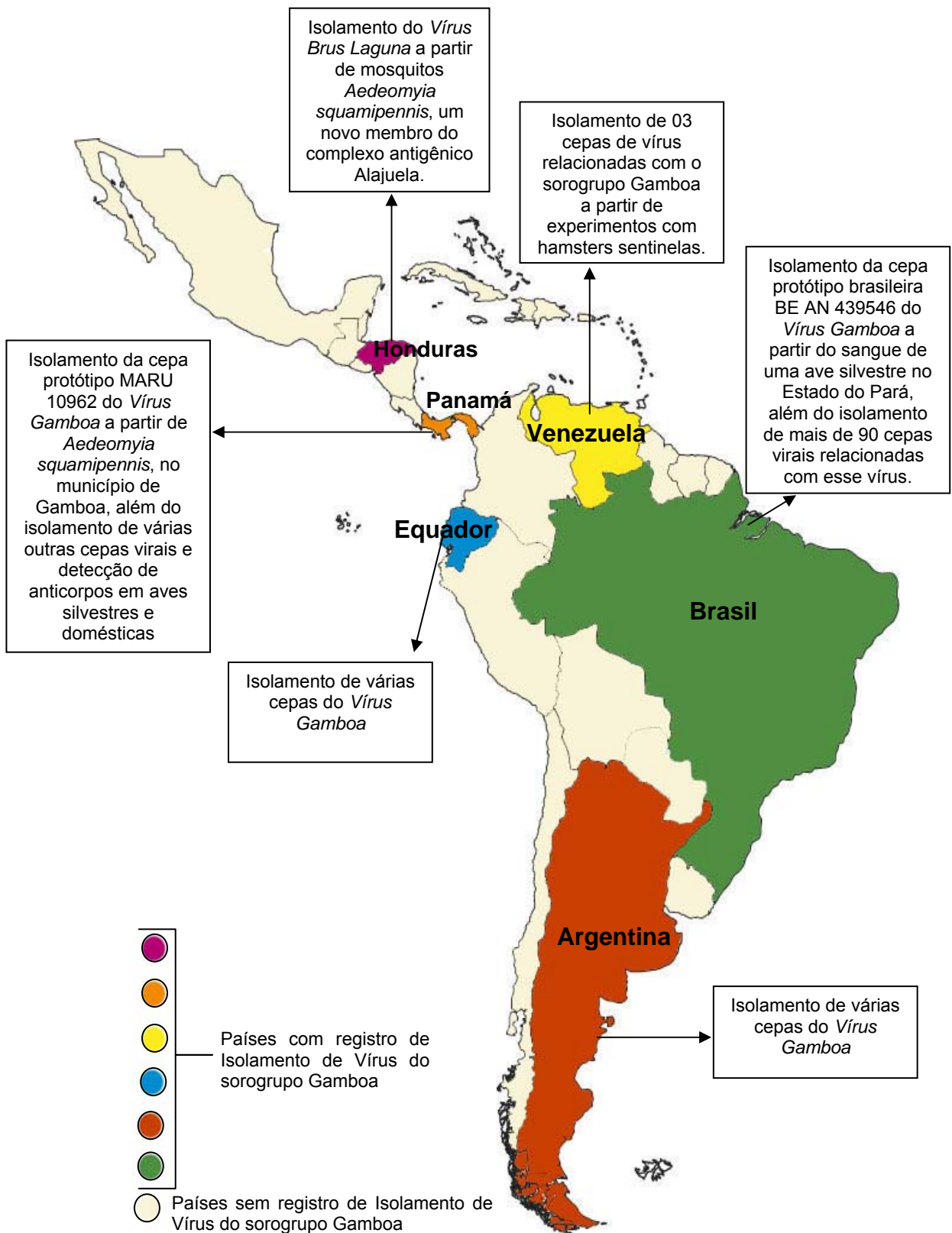


Figura 5 – Distribuição geográfica dos vírus do sorogrupo Gamboa.

A maioria absoluta dos vírus do sorogrupo Gamboa foi obtida a partir de mosquitos da espécie *Aedeomyia squamipennis*, havendo como exceção apenas dois isolamentos de *Mansonia dyari* (Galindo *et al.*, 1983) e um de *Anopheles triannulatus* (Dégalier *et al.*, 1992a; Vasconcelos *et al.*, 2001), demonstrando que esta espécie de mosquito é provavelmente o principal vetor em potencial para a transmissão dos vírus do sorogrupo Gamboa (Figura 6). Além dos isolamentos a partir de artrópodes hematófagos, quatro cepas do VGAM foram obtidas a partir do sangue de aves silvestres (Dégalier *et al.*, 1992a).

Adicionalmente, estudos sorológicos realizados no Panamá, Equador e Argentina, demonstraram a presença de anticorpos neutralizantes para o VGAM em uma grande quantidade de soro de várias espécies de aves silvestres e domésticas, tais como galinhas, patos, pombos, perus e gansos, implicando estes animais como hospedeiros em potencial para o VGAM (Figura 6). Por outro lado, quantidade inexpressiva ou quase nula de anticorpos para esse vírus foi encontrada em soro de outras espécies de animais silvestres, como roedores e carnívoros (Calisher *et al.*, 1981; Monath *et al.*, 1985).

Desde o isolamento da cepa protótipo MARU – 10962 do VGAM no ano de 1962 e o estabelecimento do sorogrupo Gamboa a partir de testes sorológicos no ano de 1981 (Calisher *et al.*, 1981), nenhum estudo adicional com estes vírus foi realizado. Até o momento, se desconhece associação com doenças em animais e em humanos com os vírus desse sorogrupo, embora seja de amplo conhecimento que vários fatores ligados a mudanças climáticas e ambientais podem alterar o comportamento dos hospedeiros vertebrados e

vetores artrópodes, assim como a própria evolução dos vírus, levando a emergência e re-emergência de vários desses agentes, os quais podem causar sérios danos à saúde pública (Taylor *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001; Chomel *et al.*, 2007; Elliott, 2009).

Dessa forma, estudos adicionais sobre os vírus do sorogrupo Gamboa, tornam-se necessários, uma vez que pouco ou quase nada se conhece a cerca de seu comportamento em natureza. Além de que informações sobre a estrutura molecular, organização genômica e evolução genética dos vírus do sorogrupo Gamboa podem vir a reforçar as informações já obtidas pelos testes sorológicos clássicos sobre o relacionamento das cepas virais do grupo antigênico Gamboa e orientar quanto ao posicionamento genético desses vírus no gênero *Orthobunyavirus* da família *Bunyaviridae*.

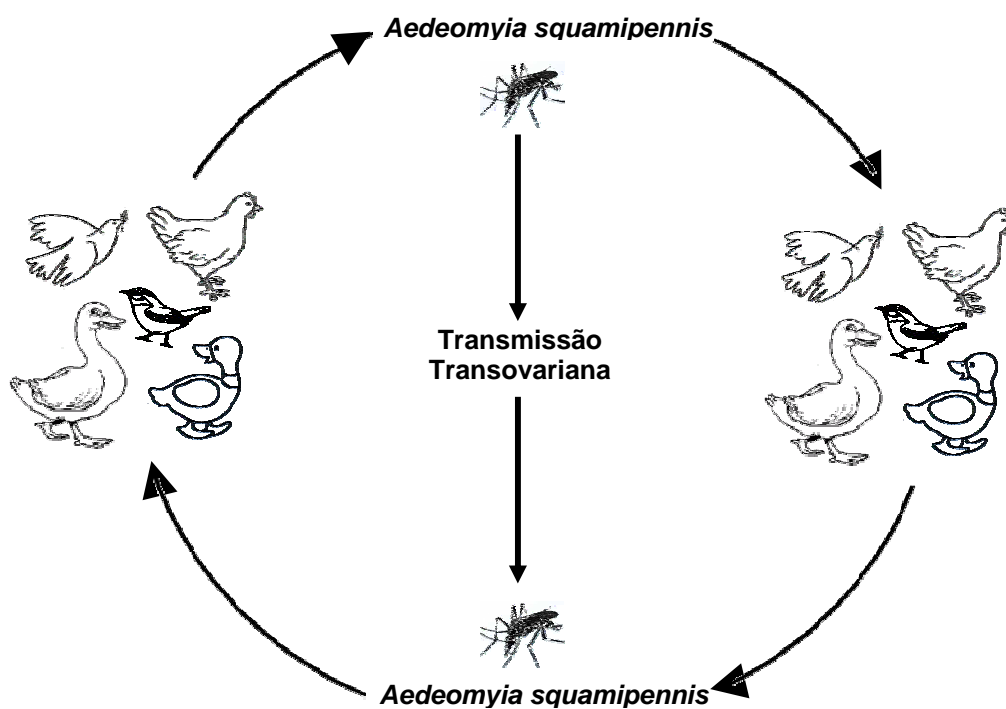


Figura 6 – Provável ciclo de manutenção dos vírus do sorogrupo Gamboa

1.4 MOSQUITO *AEDEOMYIA SQUAMIPENNIS*

A espécie de mosquitos, *Aedeomyia squamipennis* (Figura 7), é a única pertencente ao gênero *Aedeomyia* (Tribo Aedeomyiini, família Culicidae), encontrando-se distribuída nos países do Novo Mundo. Esse mosquito é bastante encontrado em lagos artificiais com abundante vegetação, como as *Pistia sp.* e *Azolla sp.* (Dyar, 1928; Horsfall, 1955; Gabaldon *et al.*, 1981). O *Aedeomyia squamipennis* possui hábitos noturnos e as fêmeas são tidas como dotadas de preferência por sangue de aves. Apesar disso, embora de maneira rara, elas têm sido coletadas mediante a utilização de atração de equinos e mesmo atração humana esclarecida (Foratini, 2002). A competência vetorial dessa espécie foi demonstrada mediante estudo onde se realizou o isolamento de vírus do sorogrupo Gamboa na Argentina, Equador, Panamá e Brasil (Calisher *et al.*, 1981, 1983; Mitchell *et al.*, 1985, 1987). Ademais, um estudo realizado por Dutary e colaboradores (1989) demonstrou a transmissão transovariana do *Vírus Gamboa* em mosquitos *Aedeomyia squamipennis*.



Figura 7 – Mosquito da espécie *Aedeomyia squamipennis*.

Fonte: www.sta.uwi.edu/fsa/lifesciences/dchadee.asp

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Desenvolver estudos genéticos com os vírus do sorogrupo Gamboa isolados nas Américas, realizando a análise filogenética comparativa desses com outros orthobunyavírus e estudos patológicos e sorológicos com o *Vírus Gamboa* (BE AN 439546) isolado no Instituto Evandro Chagas.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Amplificar e obter sequências nucleotídicas parciais do segmento M, glicoproteína Gn de vírus do sorogrupo Gamboa isolados nas Américas;
- Realizar análise filogenética comparativa entre os membros do sorogrupo Gamboa e outros orthobunyavírus;
- Estudar a histopatologia e a distribuição do antígeno viral por imunohistoquímica nos diferentes órgãos de pintos recém nascidos da espécie *Gallus gallus domesticus* experimentalmente infectados com o *Vírus Gamboa* (BE AN 439546);
- Avaliar a soroprevalência para o *Vírus Gamboa* (BE AN 439546) pelo teste de inibição da hemaglutinação em soros de aves, outros animais silvestres (roedores, marsupiais, etc.) e humanos procedentes de Tucuruí.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram desenvolvidos observando-se as normas e os critérios pré-estabelecidos e exigidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança. Os que envolveram manipulação direta com os vírus foram realizados em cabines de biossegurança classe II (B2) e os que utilizaram substâncias tóxicas foram realizados em capelas de exaustão.

2.1 AMOSTRAS

Doze cepas liofilizadas de VGAM, obtidas da coleção de vírus do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC) foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho (Quadro 4), sendo escolhidas de forma aleatória.

Os liofilizados virais foram reconstituídos com 0,5 mL de água destilada estéril à temperatura de 4 °C e, em seguida, diluídos em 0,5 mL de solução salina tamponada (PBS), pH 7,4, contendo 0,75 % de albumina bovina e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Imediatamente, as amostras foram inoculadas em camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços recém nascidos pela via intracerebral (i.c.) no volume de 0,02 mL (Lennette, 1995). Observações diárias foram realizadas até os animais apresentarem sinais de doença, quando então foram coletados, identificados e armazenados em freezer à temperatura de – 70 °C até o uso.

Quadro 4 – Cepas de *Vírus Gamboa* do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas que foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

N.º	REGISTRO	FONTE DE OBTENÇÃO	LOCAL DO ISOLAMENTO	DATA DA COLETA	ORIGEM
1	BE AN 439546	Sangue de ave	Tucuruí – Pará	27/11/1985	<i>Geotrygon montana</i>
2	BE AN 448848	Sangue de ave	Tucuruí – Pará	01/05/1986	<i>Geotrygon montana</i>
3	BE AR 470618	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	25/11/1987	<i>Anopheles (Nys.) triannullatus</i>
4	BE AR 470712	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	27/11/1987	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
5	BE AR 474122	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	29/03/1988	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
6	BE AR 502068	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	27/11/1986	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
7	BE AR 502380	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	05/12/1986	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
8	BE AR 510329	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	07/10/1987	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
9	BE AR 510340	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	07/10/1987	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
10	BE AR 512576	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	22/03/1988	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
11	BE AR 513690	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	19/03/1988	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
12	BE AR 514527	Lote de mosquitos	Tucuruí – Pará	15/04/1988	<i>Aedeomyia squamipennis</i>

Outras dez cepas de vírus identificadas sorologicamente como pertencentes ao sorogrupo Gamboa foram utilizadas, tendo os mesmos sido obtidos da coleção de vírus do acervo da *University of Texas Medical Branch* (UTMB), Galveston, Texas, Estados Unidos da América (EUA) (Quadro 5).

Quadro 5 – Cepas de *Vírus Gamboa* do acervo da *University of Texas Medical Branch* (UTMB) que foram utilizadas para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

N.º	REGISTRO	VÍRUS	LOCAL DE ISOLAMENTO	ANO DE COLETA	ORIGEM
1	MARU 10962	<i>Gamboa</i>	Panamá	1962	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
2	HBL7-2CH	<i>Brus Laguna</i>	Honduras	1967	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
3	75V-446	<i>San Juan</i>	Equador	1974	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
4	E4-816	<i>Pueblo Viejo</i>	Equador	1974	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
5	TR 61469	Gamboa-like	Suriname	NI*	<i>Aedes sp.</i>
6	GML 903021	Gamboa-like	Panama	1977	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
7	GML 903023	Gamboa-like	Panama	1977	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
8	GML 382916	Gamboa-like	Panama	1985	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
9	GML 435718	Gamboa-like	Panama	1986	<i>Aedeomyia squamipennis</i>
10	GML 438524	Gamboa-like	Panama	1987	<i>Aedeomyia squamipennis</i>

*NI: Não informado

2.2 PROPAGAÇÃO DOS VÍRUS PARA PRODUÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

A célula utilizada para a propagação das amostras dos VGAM foi a linhagem celular VERO (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*). Para este fim, foi preparada uma suspensão viral a partir da maceração de cérebros de camundongos albinos suíços recém nascidos infectados com os vírus que foram utilizados neste estudo (Quadros 4 e 5), na proporção de 1:10 em PBS, pH 7,4, contendo 0,75 % de albumina bovina e antibióticos, seguida da centrifugação do material a 8.000 rotações por minuto (rpm) durante dez minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante dessa suspensão viral foi

inoculado em garrafas de 75 cm² contendo uma monocamada confluyente de células e mantidas em meio de manutenção 199 enriquecido com 5 % de soro bovino fetal (Lenette, 1995). As garrafas foram verificadas diariamente até a observação de efeito citopático (ECP) em 70 a 75 % da monocamada celular. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi colhido, aliquotado em tubos estéreis de 1,5 mL, identificados e armazenados em freezer à temperatura de – 70° C. Este material foi utilizado para a obtenção do RNA viral.

2.3 ESTUDOS MOLECULARES

2.3.1 Extração do RNA Viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir do sobrenadante de cultura de células VERO infectadas com os vírus em estudo, empregando o protocolo desenvolvido por Ni & Barret (1995) pelo método do reagente TRIZOL LS. Este produto é uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, sendo amplamente utilizado para o isolamento de DNA/RNA de células e patógenos. Este reagente age mantendo a integridade do material genético enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Em microtubos estéreis de 1,5 mL, foram adicionados 250 µL das amostras virais e 750 µL de TRIZOL LS. Após incubação por cinco minutos à temperatura ambiente (TA), foi adicionado 200 µL de clorofórmio e o material foi incubado por dez minutos à TA para promover a separação do RNA de

outros componentes orgânicos. Após este período o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos à temperatura de 4 °C. O material genético fica localizado em uma camada aquosa situada acima da camada orgânica constituída por restos celulares, clorofórmio e o TRIZOL LS. Após a transferência da fase aquosa para outro microtubo estéril de 1,5 mL, o RNA foi recuperado por precipitação, com a adição de 500 µL de isopropanol, incubação por 10 minutos à TA, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por dez minutos à temperatura de 4 °C. Após a retirada do isopropanol, foi adicionado 1.000 µL de etanol a 75 %, sendo imediatamente centrifugado a 7.500 rpm por cinco minutos à temperatura de 4 °C. O etanol foi completamente desprezado. O material genético obtido foi reconstituído em água livre de DNase e RNase, sendo armazenado a – 70 °C para uso posterior.

2.3.2 Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR)

Para a amplificação do genoma dos VGAM em estudo, foi utilizada a técnica de RT-PCR em dois passos, empregando iniciadores específicos para o segmento M-RNA (Fulhorst *et al.*, 1996) (Quadro 6).

Quadro 6 – Iniciadores utilizados na técnica de RT-PCR para amplificação do genoma dos VGAM em estudo.

INICIADOR	SEQUÊNCIA (5' - 3')	SEGMENTO/ GENE	PRODUTO (nt)	TÉCNICA
M 14 C	CGGAATFCAGTAGTGTACTACC	MRNA/Gn*	600	RT
M 619 R	GACATATGCTGATTGAAGCAAGCATG	MRNA/Gn*	600	PCR

* Fulhorst *et al.*, 1996

As reações de RT-PCR foram processadas em termociclador automático (*GeneAmp PCR Systems 9600, Perkin-Elmer*). Inicialmente, foi realizada a transcrição reversa (RT), que foi ajustada para o volume de 10 μL contendo: 5 μL de RNA viral e 5 μL da mistura de RT contendo 50 pmol do iniciador M14C, tampão de RT 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM, MgCl₂ 2,5 mM), DTT 2,5 mM, 20 U de enzima inibidora de RNase (RNasin RNase inibitor, Invitrogen), 200 μM de dNTPs (Invitrogen) e 1 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II Reverse Transcriptase, Invitrogen). A reação de RT foi realizada por 90 minutos a 42 °C. Os produtos da RT foram usados na reação de PCR com volume ajustado para 50 μL contendo: 5 μL de DNA complementar (cDNA) e 45 μL da mistura de PCR contendo tampão de PCR 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM, MgCl₂ 2,5 mM), 200 μM de dNTPs (Invitrogen), 50 pmol dos iniciadores específicos (M14C/M619R) e 1,125 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). A PCR foi realizada em 35 ciclos de amplificação, sendo que cada um foi composto por etapas de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 52 °C por um minuto e síntese a 72 °C por um minuto e 30 segundos.

2.3.3 Análise do Produto da RT-PCR

Os produtos amplificados das amostras foram visualizados em gel de agarose a 1,5 % diluídos em TAE 1X (Tris 10 mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1 mM pH 7,2) contendo brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/mL. Junto com as amostras foi utilizado um marcador de peso e massa molecular (Low DNA Mass - 100 bp ladder, Invitrogen), um controle negativo de extração (amostra de sobrenadante de células VERO não infectadas) e um controle (água livre de ribonucleases) para verificar possíveis contaminações durante a RT-PCR. As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal durante 30 minutos sob uma diferença de potencial de 80 V e 7 mA e observadas em transiluminador com emissão de raios ultravioletas.

2.3.4 Purificação do DNA Complementar

A purificação do cDNA foi realizada a partir das bandas visualizadas no gel de agarose, utilizando o *kit* comercial *GFX PCR DNA and Gel Band purification* (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, as bandas visualizadas no gel de agarose foram cortadas e separadas em microtubos estéreis de 1,5 mL (os quais haviam sido pesados vazios). Em seguida, os microtubos com as bandas foram pesados e o valor do peso foi subtraído do peso do microtubo vazio. Posteriormente, foi adicionado ao microtubo 10 µL do tampão de captura para cada 10 mg do peso do gel contendo as bandas com o cDNA. Os microtubos foram agitados

vigorosamente e incubados em banho-maria a 60 °C até a agarose dissolver completamente. As colunas GFX foram montadas no tubo coletor e o material dissolvido foi adicionado à coluna. O material foi Incubado à TA por um minuto e centrifugado a 12.000 rpm por 30 segundos. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e recolocado à coluna GFX. Em seguida, foi adicionado 500 µL do tampão de lavagem na coluna e novamente centrifugada a 12.000 rpm por 30 segundos. O tubo coletor foi descartado e a coluna colocada em um microtubo estéril de 1,5 mL, sendo adicionada 50 µL de água livre de ribonucleases no topo da coluna e incubado à TA por um minuto. Finalmente, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por um minuto e o cDNA purificado armazenado à temperatura de – 70 °C para uso posterior.

2.3.5 Sequenciamento Nucleotídico das Amostras Virais

As sequências nucleotídicas dos vírus do grupo Gamboa foram obtidas em sequenciador automático de capilar modelo 3130 (Applied Biosystems) usando o *Kit ABI PRISM Dye Terminator* (Applied Biosystems), empregando o método de terminação de cadeia como descrito por Sanger e colaboradores (1977). A estratégia de sequenciamento foi a mesma descrita por Kuno & Chang (2005). Para este fim, foram utilizados 4 µL de *Terminator ready reaction mix*, 80 ng do produto de PCR purificado do gene M, 3,5 pmoles dos iniciadores descritos no quadro 6 e água livre de RNase e DNase para o volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems), usando um programa específico que

consiste de 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96 °C por dez segundos, anelamento dos iniciadores a 50 °C por cinco segundos e extensão a 60 °C por quatro minutos. A precipitação do DNA foi realizada pela adição de 2 µL de NaCH₃COO 3M pH 5,0 e 50 µL de etanol a 96 % ao volume total da reação de sequenciamento. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo por dez minutos e precipitadas por centrifugação durante 15 minutos a 14.000 rpm à temperatura de 8 °C. O material precipitado foi lavado com 250 µL de etanol a 70 %, centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos à temperatura de 8 °C e finalmente incubado à TA para completa evaporação do etanol. As amostras foram reconstituídas com 3 µL de solução de formamida e EDTA 25 mM pH 8,0 na proporção 5:1. Em seguida, foi realizada a eletroforese do material no seqüenciador automático. As seqüências referentes a cada segmento de RNA genômico de cada isolado viral foram analisadas utilizando o programa *Sequencer, version 3.0 (GeneCodes) software*.

2.3.6 Análise Filogenética Comparativa

As seqüências nucleotídicas obtidas para o segmento M-RNA referentes aos vírus do grupo Gamboa foram comparadas entre si, bem como com seqüências nucleotídicas de outros orthobunyavírus pertencentes aos grupos antigênicos Bunyamwera, Califórnia, Simbu e Turlock, disponíveis no banco de dados do *Genbank* (Quadro 7). Para esse fim, inicialmente as seqüências foram alinhadas pelo programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997),

implementado pelo programa BioEdit versão 5.0 (Hall, 2001), bem como pelo programa MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 2000).

Quadro 7 – Sequências do segmento M-RNA de Orthobunyavirus utilizados para realizar a análise filogenética comparativa com os vírus do sorogrupo Gamboa.

VÍRUS	CEPA	NÚMERO DE ACESSO
<i>Vírus Anhembi</i>	SpAr2984	AY593745
<i>Vírus Batai</i>	MM2222	DQ375394
<i>Vírus Be AR328208</i>	Be AR328208	AY593743
<i>Vírus Birao</i>	YMP-1	AY593748
<i>Vírus Bozo</i>	DakArB7343	AY593739
<i>Vírus Chatanga</i>	LEIV18677	GQ355974
<i>Vírus Encefalite California</i>	BFS283	AF123483
<i>Vírus Fort Sherman</i>	86-MSP18	AY593734
<i>Vírus Germiston</i>	pMG 5.75,12	M21951
<i>Vírus Iaco</i>	BeAr314206	AY593746
<i>Vírus Ilesha</i>	RML2	AY593730
<i>Vírus Inkoo</i>	KN3641	U88059
<i>Vírus Jamestown Canyon</i>	61V2235	U88058
<i>Vírus Jatobal</i>	?	AF312380
<i>Vírus Jerry Slough</i>	BFS4474	AF123487
<i>Vírus Kaeng Khoi</i>	A016465	AY843038
<i>Vírus Keystone</i>	C14031-33	AF123489
<i>Vírus La Crosse</i>	LACR56869	U70205
<i>Vírus Lokern</i>	FMS4332	AY593736
<i>Vírus Lumbo</i>	SA Ar 1881	AF123484
<i>Vírus Macaua</i>	Be AR306329	AY593742
<i>Vírus Maguari</i>	CBAAR426	AY593735
<i>Vírus Mboke</i>	DakArY357/6e	AY593731
<i>Vírus Melao</i>	TRVL9375	U88057
<i>Vírus Ngari</i>	DakArD28542/4e	AY593747
<i>Vírus Northway</i>	0234	EU004188
<i>Vírus Oriboca</i>	LCVP-217	AF499013
<i>Vírus Oropouche</i>	TR9760	AF312381
<i>Vírus Playas</i>	75V3066	AY593733
<i>Vírus Potosi</i>	89-3380	AY593750
<i>Vírus San Angelo</i>	ATCC VR-723	AF123486
<i>Vírus Serra do navio</i>	Be AR103645	AF123490

Quadro 7 – Sequências do segmento M-RNA de Orthobunyavirus utilizados para realizar a análise filogenética comparativa com os vírus do sorogrupo Gamboa.

Continuação

N.º	VÍRUS	CEPA	NÚMERO DE ACESSO
33	<i>Vírus Shokwe</i>	SAAr4042	AY593749
34	<i>Vírus Snowshoe hare</i>	Não informado	K02539
35	<i>Vírus Sororoca</i>	Be AR32149	AY593744
36	<i>Vírus South River</i>	NJO 94F	AF123488
37	<i>Vírus Tahyna</i>	Bardos 92	AF123485
38	<i>Vírus Taiassui</i>	Be AR671	AY593740
39	<i>Vírus Tensaw</i>	B479-490	AY593737
40	<i>Vírus Tlacotalpan</i>	61-D-240	AY593732
41	<i>Vírus Trivittatus</i>	Eklund	AF123491
42	<i>Vírus Umbre</i>	G16283	EU678356
44	<i>Vírus Wyeomyia</i>	Protótipo	AY593741
45	<i>Vírus Xingu</i>	Be H388464	AY593738

As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos: agrupamento de vizinhos (AV - *Neighbour-joining*) (Saitou & Nei, 1987), máxima parcimônia (MP), implementados pelo programa PAUP versão 4 (Swofford, 2002); máxima verossimilhança (MV) (Goldman *et al.*, 2000) pelo programa Phym1 (Guindon & Gascuel, 2003); e análise bayesiana, utilizando o programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

O programa Modeltest versão 3.7 (Posada & Crandall, 1998) foi utilizado para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica a ser usado com base no critério de informação de Akaike (*Akaike information criterion*, AIC). Para os métodos de MV e AV, os valores de *bootstrap* foram baseados em 1.000 pseudoréplicas para gerar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos (Felsenstein, 1985). A análise de divergência e similaridade

entre os 21 vírus do sorogrupo Gamboa utilizados neste estudo foi realizada pelo programa MEGA 4.1 (Kumar *et al.*, 2000).

A análise bayesiana foi realizada empregando o modelo de Markov Monte Carlo (Markov Chain Monte Carlo, MCMC). A análise foi feita para dois milhões de réplica, sendo a amostragem fixada a cada 1.000 árvores geradas. Os valores de probabilidade posterior foram estimados em 50 % das árvores geradas (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). O Programa TRACER foi utilizado para verificar se a análise realizada pelo programa MrBayes alcançou a convergência apropriada.

2.4 ESTUDO EXPERIMENTAL EM PINTOS RECÉM-NASCIDOS (*Gallus gallus domesticus*).

Para o desenvolvimento do estudo experimental em pintos recém nascidos (2 dias) da espécie *Gallus gallus domesticus*, foi utilizada a cepa protótipo brasileira do VGAM, Be AN 439546, com título do inóculo de 5,5 DL₅₀/0,02 mL. Uma suspensão viral foi preparada a partir da maceração de cérebros de camundongos albinos suíços recém nascidos infectados, na proporção de 1:10 em PBS, pH 7,4, contendo 0,75 % de albumina bovina e antibióticos, seguida da centrifugação do material a 8.000 rpm durante dez minutos, à temperatura de 4° C. A suspensão foi inoculada em pintos recém nascidos através das vias i.c. e sub cutânea (s.c.). Para a via i.c. foi utilizado 0,1 mL da suspensão viral e 0,2 mL para a via s.c.

Três grupos de pintos recém nascidos foram formados, sendo um grupo controle, um grupo infectado através da via i.c. e o outro grupo infectado pela via s.c. Um animal de cada um dos três grupos foi sacrificado a cada 24 horas pós-infecção (p.i.), até completar 11 dias p.i., sendo ainda realizada uma última coleta no 18º dia p.i. De cada animal foi retirado o sangue, para a obtenção de soro, no qual foi realizada a pesquisa de anticorpos através da técnica de IH, para traçar o perfil da resposta sorológica ao VGAM nesses animais. Foram ainda colhidas amostras de cérebro, fígado, rim, baço, pulmão e coração, as quais foram imediatamente fixadas em solução de formalina tamponada a 10 %, para estudos histopatológicos e imunohistoquímicos.

2.4.1 Histopatologia e Imunohistoquímica

Após a fixação das amostras de tecidos dos pintos recém nascidos infectados (i.c. e s.c.), e não infectados (controle), estas foram processadas para análise histopatológica. O procedimento inicial constou na desidratação das amostras em banhos crescentes de álcool de 70 a 100 % seguido, da passagem do material por duas vezes em banho de xilol e três banhos consecutivos em parafina líquida, mantida à temperatura de 60 °C. Em seguida, foi realizada a inclusão do material para a formação de blocos de parafina que possibilitou a microtomia das amostras em cortes de 4 µm, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina – eosina (HE) (Prophet *et al.*, 1992; Michalany, 1998) e examinados em microscópio óptico Nikon Eclipse E200.

Para a detecção de antígenos virais do VGAM foi realizada a técnica de imunohistoquímica de acordo como referido por Carvalho e colaboradores (2009). Cortes histológicos de 4 μ M dos blocos com os tecidos de pintos recém nascidos infectados com o VGAM, foram colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma). Em seguida, esse material foi desparafinado em dois banhos de xilol, um à temperatura de 56 °C durante 30 minutos e outro à TA durante 20 minutos e, em seguida, hidratado em sequência decrescente de etanol (100 %, 95 % e 70 %) e água corrente durante cinco minutos cada. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com três incubações com água oxigenada a 3 % por dez minutos em câmara escura, e em seguida as lâminas foram lavadas ligeiramente em água corrente e em água destilada por dez minutos. Na etapa seguinte, foi realizada a incubação das amostras com o anticorpo policlonal produzidos em camundongos recém nascidos contra o VGAM diluído em solução 1 % de albumina bovina fração V (Sigma) acrescida de azida sódica 0,1 % em PBS pH 7,4, permanecendo durante a noite à temperatura de 4 °C.

No dia seguinte, foram realizadas duas lavagens com PBS por cinco minutos cada e incubação com o anticorpo secundário biotilado (anti-camundongo) do *kit* comercial LSAB peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation) por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, o material foi incubado com o complexo estreptavidina-biotina peroxidase por 30 minutos à temperatura de 37 °C. A reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB) (3,3'- diaminobenzidina, SIGMA) a 0,03 % acrescida

de 1,2 mL de água oxigenada à 3 %. Finalmente, os cortes histológicos foram lavados em água corrente por dez minutos, contracorados com hematoxilina de Harris por dez segundos, sendo posteriormente lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (Fisher Scientific).

2.5 ESTUDO SOROLÓGICO

2.5.1 Produção de Antígeno Sucrose-Acetona

O antígeno viral foi preparado pelo método de extração por sucrose-acetona como descrito por Beaty e colaboradores (1995). Para este fim, foi obtido um macerado de 30 a 50 cérebros de camundongos infectados com a amostra viral BE AN 439546 do VGAM em uma solução de sacarose a 8,5 %. Este macerado foi transferido para um volume 20 vezes maior de acetona pura (P.A.) à temperatura de 4 °C, seguido de homogeneização mecânica e repouso da mistura por cinco minutos à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, sendo acrescido o mesmo volume anterior de acetona, ficando a mistura em repouso por uma hora à 4 °C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e a amostra seca em bomba de vácuo por uma hora. Após a secagem, a amostra foi hidratada com uma solução salina de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85 %, ficando em repouso por uma hora à temperatura de 4 °C. O antígeno foi coletado e centrifugado a 8.000 rpm por dez minutos à 4 °C, sendo

o sobrenadante aliquotado, identificado e armazenado à temperatura de – 70 °C para uso no teste de IH.

2.5.2 Teste de Inibição da Hemaglutinação

O teste de IH fundamenta-se na inibição da capacidade de hemaglutinação de um vírus, quando esse vírus reage com o anticorpo específico (Clarke & Casals, 1958). Para a pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o VGAM, foram utilizadas as amostras de soro obtidas durante a cinética do estudo experimental com os pintos recém nascidos, além de 631 amostras de plasmas de aves, 225 soros de outros animais silvestres (répteis, roedores, marsupiais, primatas não humanos, edentados e carnívoros) coletados após a conclusão da construção da hidrelétrica de Tucuruí no Estado do Pará, uma vez que nesta época foi possível realizar o isolamento de várias cepas do VGAM (Vasconcelos *et al.*, 2001), traçando desta forma um perfil sorológico desse vírus nesta região. Além dessas amostras, foram ainda testadas 406 amostras de soro de humanos coletadas também no município de Tucuruí nos anos de 2008 e 2009.

A técnica de IH foi realizada como descrito por Clarke e Casals (1958) e adaptada para microplacas por Shope (1963). Antes de utilizar os soros, esses foram tratados com acetona pura (P.A.) para a retirada de inibidores naturais contidos nos soros e adsorvidos com hemácias de ganso para a remoção de possíveis hemaglutininas inespecíficas. Para este fim, foram colocados em tubos 13/100 identificados, 50 µL dos soros e em cada

adicionado 450 μ L de NaCl a 0,85 %. Em seguida foi acrescentado aos tubos 6 mL de acetona P.A. gelada e agitado mecanicamente, ficando em repouso à temperatura de 4 °C durante cinco minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm durante um minuto a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado agitado. Foi acrescentado novamente 6 mL de acetona P.A. gelada e os tubos foram novamente agitados e deixados em repouso à temperatura de 4 °C durante uma hora.

Após esse tempo, o material foi centrifugado a 1.500 rpm por cinco minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos levados para secar a vácuo. O material foi hidratado com 500 μ L de solução borato salina pH 9,0. Após a completa hidratação do material, este foi adsorvido com uma suspensão de hemácias de ganso diluídas a 1:6 em solução de albumina bovina a 0,4 % em pH 9,0. Para isto, em cada tubo com as amostras hidratadas foi adicionado 0,6 mL da suspensão de hemácias de ganso, ficando em repouso à temperatura de 4 °C durante 20 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, estando o soro tratado pronto para a utilização no teste de IH.

O teste de IH foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 orifícios com fundo em "U". Inicialmente, foi realizada uma triagem com os soros tratados (a uma diluição de 1:20), sendo que os que apresentaram reação positiva foram, posteriormente, titulados com diluições de 1:40 até 1:1280. Para a etapa de triagem, foi adicionado 25 μ L dos soros tratados nos orifícios das placas já identificadas, seguido da adição de 25 μ L do antígeno

sucrose-acetona diluído previamente (para conter quatro unidades hemaglutinantes) em solução de albumina bovina a 0,4 % em pH 9,0. As placas foram incubadas à temperatura de 4 °C durante no mínimo duas horas e no máximo 16 horas.

Após esse tempo, a reação foi revelada com a adição de 50 µL de uma solução de hemácia de ganso 1:5 em solução de DGV (Dextrose, Gelatina e Veronal) diluída em solução de pH 6,0, que é o pH ótimo para o VGAM. Em seguida, as microplacas foram agitadas e incubadas à TA durante 30 minutos. A leitura do teste foi realizada observando a sedimentação das hemácias de ganso no fundo das microplacas para os soros positivos, uma vez que os anticorpos específicos presentes no soro testado inibiram a atividade hemaglutinante do vírus. Se não ocorreu sedimentação das hemácias de ganso o resultado foi considerado negativo.

Para a titulação dos soros que apresentaram reação positiva durante a etapa de triagem, foi colocado 25 µL do soro na microplaca identificada, seguido da adição de 25 µL de solução de albumina bovina 0,4 % em pH 9,0 no primeiro (onde se encontra o soro) ao sexto orifício da placa, sendo transferido com uma micropipeta 25 µL do primeiro ao sexto orifício. Em seguida foi acrescentado 25 µL de antígeno do VGAM em cada orifício contendo o soro. As microplacas foram então incubadas à temperatura de 4 °C entre duas a 16 horas e, finalmente, o teste revelado conforme a etapa de triagem. A leitura foi realizada utilizando o mesmo padrão da triagem, porém observando-se até que diluição houve sedimentação das hemácias, estabelecendo desta forma os títulos de anticorpos para os soros positivos.

2.5.3 Teste de Fixação do Complemento

O teste de FC está baseado na capacidade que o complemento tem de se ligar (ser fixado) na presença de um complexo antígeno-anticorpo (Santos, 2002). Foi utilizada a microtécnica de Fulton & Dumbell (1946) adaptada para placas (Beaty *et al.*, 1989), sendo realizada em dois estágios: primeiramente, coloca-se o antígeno suspeito para reagir com os soros conhecidos e com o complemento. Em uma segunda fase, adiciona-se o sistema revelador, composto por glóbulos de carneiro e hemolisina (soro de coelho anti-glóbulos de carneiro). Se na primeira etapa, o anticorpo for específico para o antígeno, ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo, fazendo com que o complemento seja consumido, não podendo agir na segunda etapa. Na ausência do complemento livre, não ocorrerá a lise das hemácias de carneiro, que irão sedimentar no fundo da placa formando um botão, indicando um resultado positivo. No caso do resultado negativo, não haverá a formação do complexo antígeno-anticorpo, deixando o complemento livre para lisar as hemácias de carneiro sensibilizadas pela hemolisina, que é um soro antihemácias de carneiro.

A interpretação dos resultados foi feita baseando-se no percentual de hemólise observado, sendo considerada positiva toda reação que não apresentou hemólise ou que seja de até 25 % (Quadro 8).

Quadro 8 – Representação dos valores usados na leitura do teste de FC de acordo com a percentagem de hemólise das hemácias de carneiro.

PERCENTAGEM DE HEMÓLISE	RESULTADO	VALOR
0%	Reação positiva	4
25%	Reação positiva	3
50%	Reação negativa	2
75%	Reação negativa	1
100%	Reação negativa	0

O teste de FC foi utilizado para observar a relação antigênica entre as cepas de VGAM selecionadas para este trabalho, além de comprovar a replicação viral dessas cepas em células VERO.

2.5.4 Teste de Neutralização

A neutralização do vírus é definida como a perda da capacidade de causar infecção através de sua reação com o anticorpo específico. O TN foi realizado utilizando diluições seriadas de dez vezes do vírus Be AN 439546 e diluição constante dos soros (Casals, 1967). As misturas vírus-soro diluídas foram incubadas a 37 °C por uma hora para facilitar o processamento da reação, sendo, em seguida, 0,02 mL de cada diluição, inoculada via i.c. em camundongos albinos suíços recém nascidos. A dose letal mínima para matar 50% dos camundongos infectados com 0,02 mL da suspensão viral ($DL_{50}/0,02\text{mL}$) foi calculada pelo método descrito por Reed & Muench (1938), sendo considerados positivos os soros que apresentaram um índice logarítmico de neutralização (ILN) maior ou igual a 1,8 $DL_{50}/0,02\text{mL}$.

O TN foi utilizado para confirmar a presença de anticorpos para o VGAM nas amostras de plasma de aves e no soro de outros animais silvestres e humanos que apresentaram anticorpos para o VGAM no teste de IH, uma vez que o TN apresenta especificidade maior que a do teste de IH.

3 RESULTADOS

3.1 ESTOQUE E PROPAGAÇÃO VIRAL

Todas as doze cepas brasileiras de VGAM selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho (quadro 4) foram viáveis em camundongos albinos suíços recém nascidos, sendo realizada apenas uma passagem nesses animais a partir do material original liofilizado. Os animais adoeceram e foram coletados em dias variados, entre oito a 12 dias p.i. de acordo com a cepa do VGAM inoculada (Quadro 9). Ressalta-se que todos os camundongos apresentaram os mesmos sinais de doença, sendo caracterizados por prostração, astenia, tremores e paralisia das patas traseiras.

Também em células VERO, todas as doze amostras virais utilizadas neste trabalho causaram o mesmo ECP, sendo caracterizado pela destruição da monocamada, devido à morte celular, com arredondamento das mesmas (Figura 8). A replicação em células VERO das 12 cepas do VGAM foi confirmada por teste de FC, apresentando títulos $\geq 8/32$ da recíproca mais alta da diluição do antígeno pela recíproca mais alta da diluição do soro para todas as amostras virais trabalhadas. Também foi observada uma variação no tempo de início do ECP nas células VERO, assim como para o início de doença para os camundongos albinos suíços recém nascidos, porém a variação foi um pouco maior para as células VERO (3 a 10 dias p.i.) do que para os camundongos (Quadro 9).

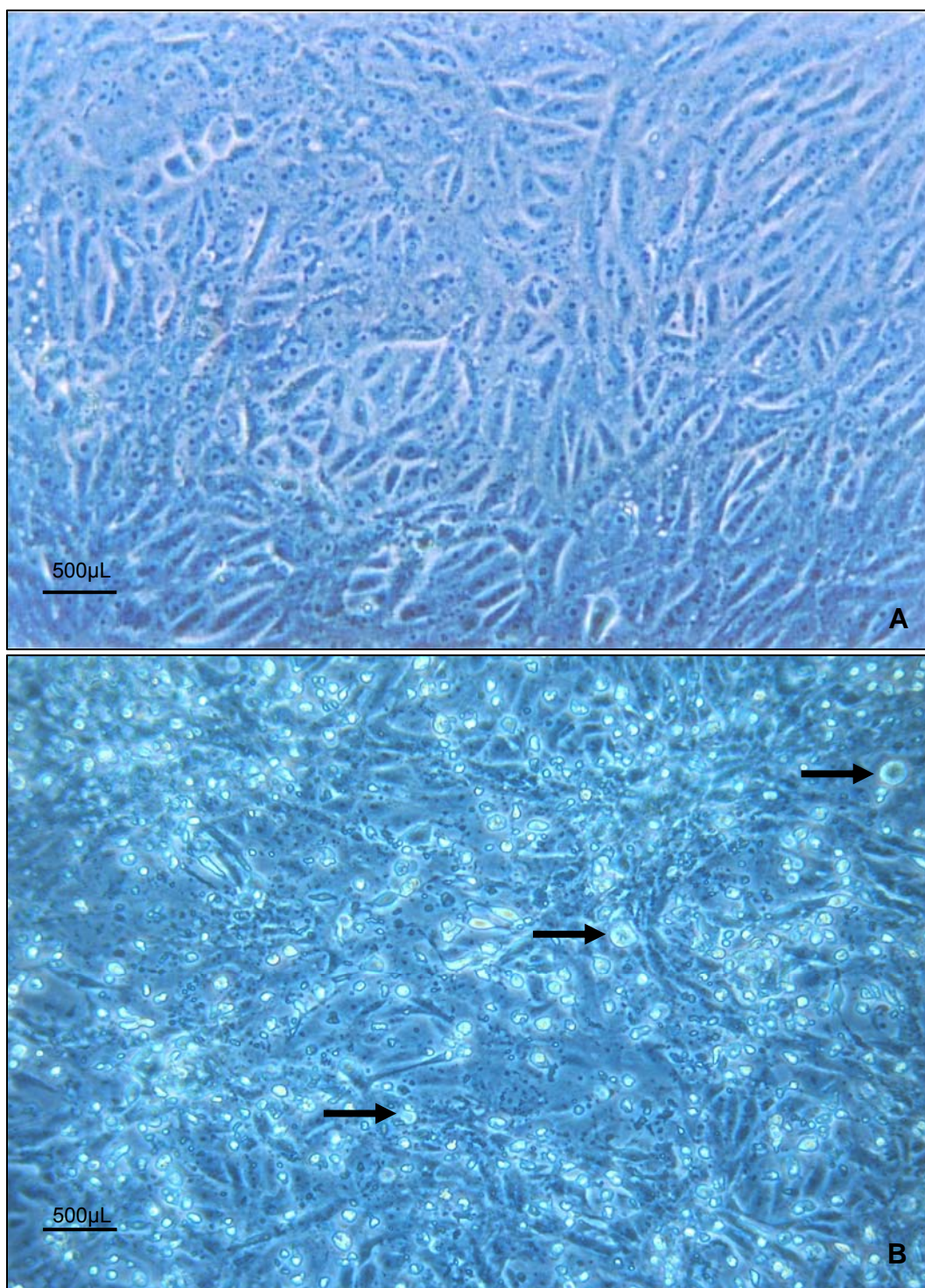


Figura 8 – Fotomicrografia de contraste de fase mostrando cultivo de célula VERO controle, demonstrando a monocamada confluenta de células de aspecto fusiforme (A); e ECP causado pela infecção da cepa BE AR513690 do VGAM no 5º dia p.i, demonstrando a destruição da monocamada celular com arredondamento das células - setas (B).

Quadro 9 – Relação dos dias de coleta pós-infecção das cepas do VGAM em células VERO e camundongos albinos suíços recém nascidos.

AMOSTRA	N.º DE PASSAGENS DO LIOFILIZADO	CAMUNDONGO RECÉM-NASCIDO (dia pós-infecção)	CÉLULA VERO (dia pós-infecção)
BE AN 439546	2 ^a	9 ^o	4 ^o
BE AN 448848	2 ^a	9 ^o	3 ^o
BE AR 470618	2 ^a	8 ^o	5 ^o
BE AR 470712	2 ^a	8 ^o	3 ^o
BE AR 474122	3 ^a	9 ^o	3 ^o
BE AR 502068	2 ^a	10 ^o	4 ^o
BE AR 502380	2 ^a	10 ^o	3 ^o
BE AR 510329	2 ^a	11 ^o	10 ^o
BE AR 510340	4 ^a	12 ^o	8 ^o
BE AR 512576	3 ^a	8 ^o	4 ^o
BE AR 513690	2 ^a	10 ^o	4 ^o
BE AR 514527	2 ^a	8 ^o	4 ^o

3.2 ESTUDO MOLECULAR

3.2.1 Amplificação dos produtos da RT-PCR para o segmento M-RNA dos vírus do grupo Gamboa.

Todas as 12 amostras de RNA obtidas das cepas brasileiras de VGAM e das dez cepas de outros países latinoamericanos foram amplificadas parcialmente para o segmento M-RNA, ao nível do gene da glicoproteína de superfície Gn. A análise eletroforética das amostras evidenciou fragmentos

entre 500 a 600 pares de bases. Na figura 9, pode-se visualizar as bandas obtidas para as 12 cepas brasileiras de VGAM.

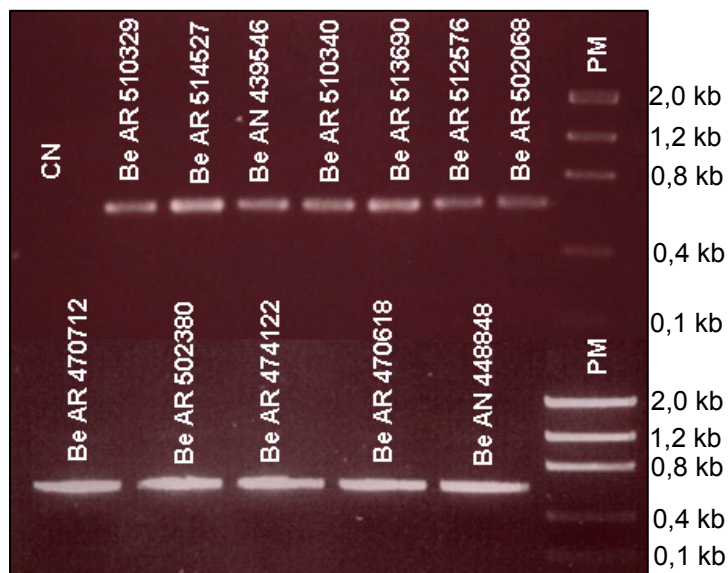


Figura 9 – Visualização dos produtos de RT-PCR para o segmento M-RNA em gel de agarose a 1,2% para as 12 cepas brasileiras de VGAM. CN: controle negativo (amostra de sobrenadante de células VERO não infectadas); PM: marcador de tamanho e peso molecular 2,0 kb – 0,1kb.

3.2.2 Análise Filogenética

Foram obtidas as sequências nucleotídicas parciais do segmento M-RNA de todas as cepas de VGAM trabalhadas neste estudo, com exceção da cepa brasileira Be AR 502068, que foi excluída da análise filogenética. As sequências consensos obtidas foram de aproximadamente 450 nucleotídeos correspondendo à posição entre os nucleotídeos 15 e 590 em relação ao gene Gn de outros orthobunyavirus dos grupos antigênicos Bunyamwera, Califórnia, Simbu e Turlock.

A análise filogenética pelos métodos de AV, MP, MV e Bayesiana das sequências nucleotídicas obtidas para as 21 cepas de VGAM amplificadas gerou árvores filogenéticas com topologias semelhantes, sendo mostrada árvore construída pelo método MV, por apresentar melhor valor de *bootstrap*, acrescidos os valores de percentual posterior do método Bayesiano (Figura 10). A árvore apresentou cinco grupos filogenéticos relacionados aos grupos antigênicos Bunyamwera (*bootstrap* de 65,8 %), Simbu (*bootstrap* de 100 %), Gamboa (*bootstrap* de 100 %), Turlock e Califórnia (*bootstrap* de 97,8 %), tendo o *Vírus Kaeng Khoi* (VKK), um orthobunyavírus não grupado, como grupo externo.

Observa-se que o grupo Califórnia (*bootstrap* de 100 %) apresenta ancestral distinto dos grupos Bunyamwera, Simbu, Gamboa e Turlock (*bootstrap* de 78,3 %), e que o ancestral desses quatro últimos grupos deu origem a duas linhagens, que, por sua vez, originaram os grupos Bunyamwera e Simbu (*bootstrap* de 65,8 %) e Gamboa e Turlock (*bootstrap* de 96,4 %).

Todas as sequências obtidas neste trabalho foram incluídas no grupo Gamboa, sendo distribuídas em dois cladogramas distintos: o clado I (*bootstrap* de 56,3 %), que agrupa as 11 cepas virais brasileiras e os VGAM e VPV, bem como a cepa TR61469 relacionada ao VGAM; e o clado II (*bootstrap* de 78,1 %) onde estão incluídos os VSJ, VBL e as amostras GML903023, GML903021, GML435718, GML382916 e GML438524. Nota-se que no clado II ocorre uma subdivisão em dois subclados (*bootstrap* 78,1 %), relacionadas aos vírus VSJ (subclado II-a, *bootstrap* de 99,7 %) e VBL (subclado II-b, *bootstrap* de 99,1 %) (Figura 10).

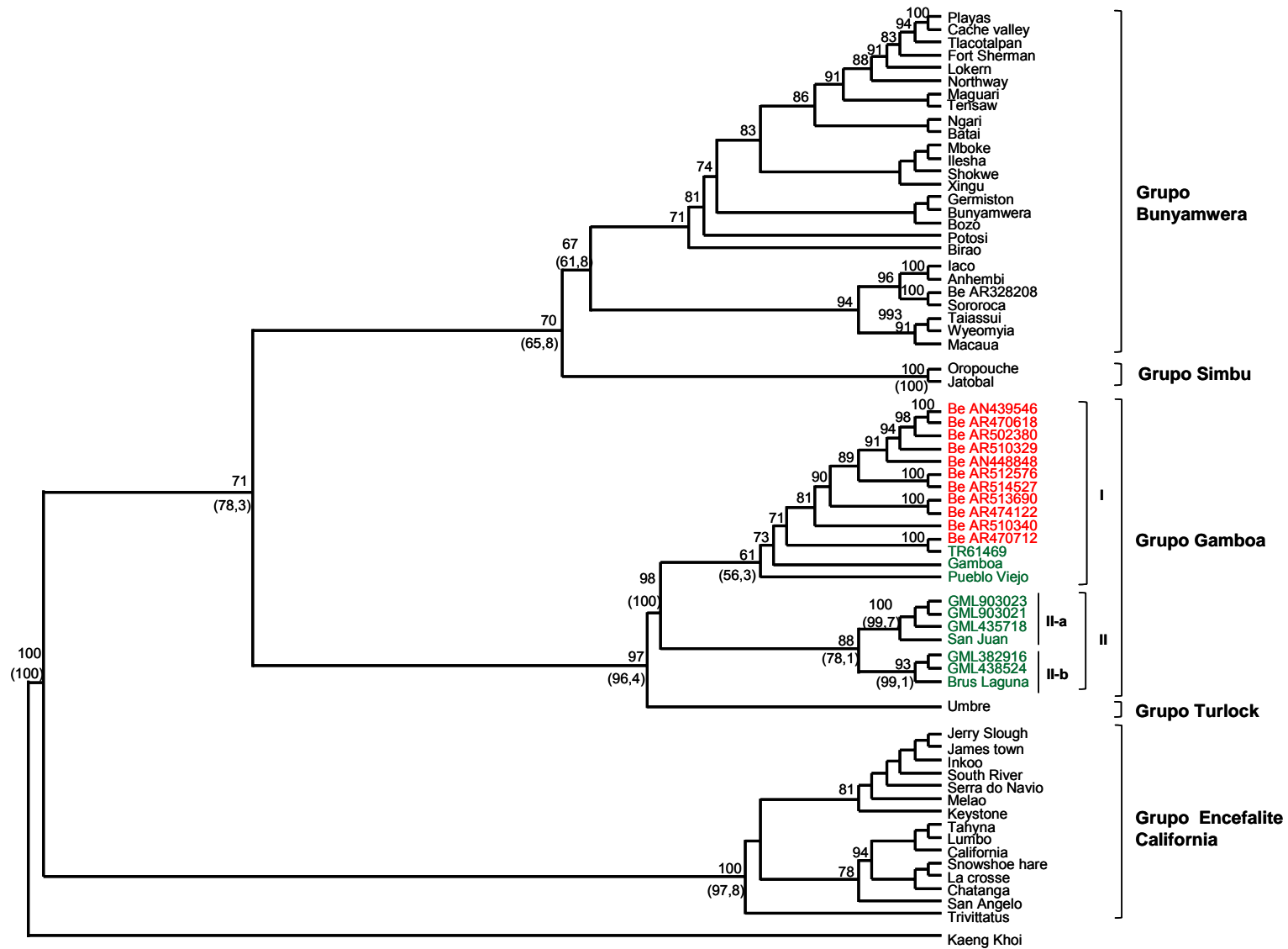


Figura 10 – Árvore filogenética pelos métodos de MV (*bootstrap* em parênteses) e Bayesiano (probabilidade posterior fora do parêntese) das sequências nucleotídicas parciais do segmento M-RNA, gene Gn, dos grupos Bunyamwera, Encefalite Califórnia, Gamboa, Simbu e Turlock. O orthobunyavírus kaeng Khoi foi utilizado como grupo externo.

3.2.3 Relação genética

A média das divergências nucleotídica e aminoacídica das 11 amostras brasileiras do VGAM foram de 4 % e 0,5 % respectivamente, enquanto que as demais amostras latinoamericanas apresentaram 62,7 % e 10,4 %, respectivamente. No grupo Gamboa, a divergência genética com base nas sequências nucleotídicas parciais do gene Gn (Δ_{dir}), para o clado I foi de 7,8 % e para o clado II de 20,1 %, já entre os cladros I e II a Δ_{dir} foi de 25,1 % e entre os subclados II-a e II-b foi de 15,7 %. Os valores das divergências nucleotídica e aminoacídica estão descritos na tabela 1.

Quanto à Δ_{dir} entre os grupos, observa-se que o grupo Gamboa apresentou uma maior Δ_{dir} com o grupo Simbu ($74,7 \pm 3,8$ %) e a menor foi com o Grupo Turlock ($51,6 \pm 3,4$ %). A Δ_{dir} entre o grupo Gamboa e os grupos Bunyamwera, Encefalite California, Simbu e com o VKK estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Divergência genética com base nas sequências nucleotídicas parciais do gene Gn entre os grupos filogenéticos.

Grupo/Vírus	Gamboa	Bunyamwera	California	Turlock	Simbu	VKK
	Desvio padrão					
Gamboa	***	3,0%	3,4%	3,4%	3,8%	4,0%
Bunyamwera	62,3%	***	2,8%	3,0%	3,2%	3,4%
Califórnia	62,1%	56,6%	***	3,4%	3,7%	3,4%
Turlock	51,6%	59,7%	64,1%	***	4,0%	4,5%
Simbu	74,7%	69,3%	76,0%	73,5%	***	4,2%
VKK	69,6%	64,8%	60,5%	67,1%	75,1%	***

Divergência genética nucleotídica

Tabela 1 – Valores percentuais de divergência aminoacídica e nucleotídica obtidos a partir de sequências nucleotídicas parciais da glicoproteína de superfície Gn, segmento M-RNA, dos vírus do sorogrupo Gamboa.

Amostras		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
		Divergência aminoacídica (%)																				
AN439546	1	***	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AN448848	2	1,0	***	0,7	0,7	0,7	0,7	2,7	0,7	0,7	0,7	0,7	6,9	2,7	5,4	15,7	15,7	9,7	9,7	15,7	19,7	10,5
AR470618	3	0,0	1,0	***	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR474122	4	0,7	1,0	0,7	***	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR502380	5	0,0	1,0	0,0	0,7	***	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR510329	6	0,7	1,0	0,7	0,7	0,7	***	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR510340	7	5,8	6,1	5,8	5,8	5,8	5,8	***	2,0	2,0	2,0	2,0	7,6	4,1	6,9	15,7	15,7	11,2	11,2	15,7	19,7	11,9
AR512576	8	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	0,3	5,4	***	0,0	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR513690	9	1,3	1,7	1,3	0,7	1,3	1,3	6,6	1,0	***	0,0	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR514527	10	0,3	0,7	0,3	0,3	0,3	0,3	5,4	0,0	1,0	***	0,0	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
AR470712	11	14,7	15,1	14,7	13,8	14,7	14,7	15,4	14,3	13,9	14,3	***	6,1	2,0	4,7	15,0	15,0	9,0	9,0	15,0	18,9	9,7
VGAM	12	42,4	41,7	42,4	40,7	42,4	42,4	57,5	41,7	39,8	41,7	52,5	***	5,4	5,4	14,2	14,2	9,7	9,7	14,2	17,3	10,5
TR61469	13	28,6	29,1	28,6	27,3	28,6	28,6	30,7	28,0	27,5	28,0	15,5	47,0	***	4,1	14,2	14,2	8,3	8,3	14,2	18,1	9,0
VPV	14	35,1	35,8	35,1	33,7	35,1	34,5	41,6	34,5	35,1	34,5	39,9	47,5	45,1	***	14,2	14,2	9,0	9,0	14,2	16,5	9,7
GML435718	15	84,4	86,4	84,4	84,4	84,4	85,4	85,9	84,4	87,2	84,4	93,9	84,0	96,4	66,2	***	0,7	11,9	11,9	0,7	8,3	12,7
GML903023	16	86,4	88,4	86,4	84,6	86,4	87,4	81,9	86,4	87,4	86,4	94,6	82,9	93,5	63,8	6,8	***	12,7	12,7	0,0	9,0	13,4
GML382916	17	75,5	75,5	75,5	75,5	75,5	76,4	90,5	75,5	74,8	75,5	76,3	81,3	72,5	68,1	63,4	63,6	***	0,0	12,7	15,0	0,7
GML438524	18	75,5	75,5	75,5	75,5	75,5	76,4	90,5	75,5	74,8	75,5	76,3	81,3	72,5	68,1	63,4	63,6	0,0	***	12,7	15,0	9,0
GML903021	19	84,6	86,7	84,6	82,9	84,6	85,6	80,2	84,6	85,6	84,6	92,8	82,9	95,3	63,8	6,4	0,3	63,6	63,6	***	0,7	13,4
VSJ	20	90,1	90,1	90,1	88,3	90,1	91,1	98,2	90,1	91,1	90,1	91,9	92,3	88,7	95,7	60,0	56,9	81,3	81,3	56,9	***	15,7
VBL	21	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,9	87,7	80,0	80,6	80,0	73,8	77,1	68,2	55,4	59,7	64,0	18,3	18,3	64,0	75,4	***
Divergência nucleotídica (%)																						

Legenda: Quadrante superior (itálico: divergência aminoacídica); Quadrante inferior (divergência nucleotídica); amostras em vermelho: cepas brasileiras do VGAM; amostras em azul: cepas latinoamericanas do VGAM; em destaque amarelo as divergências para o clado I; em destaque verde as divergências para o clado II; VBL: *Vírus Brus Laguna*; VGAM: *Vírus Gamboa*; VPV: *Vírus Pueblo Viejo*; VSJ: *Vírus San Juan*.

3.3 ESTUDO EXPERIMENTAL EM PINTOS (*Gallus gallus domesticus*)

Os pintos recém nascidos da espécie *Gallus gallus domesticus*, aparentemente não desenvolveram nenhum sinal de doença durante todo o experimento, encontrando-se ativos e aceitando bem alimentação e água, com aspecto semelhante ao dos animais controles. Durante a coleta das amostras teciduais dos três grupos de animais (controle, infectados via i.c. e infectados via s.c.), não foi visualizada nenhuma alteração macroscópica nos órgãos, permanecendo inalteradas até o final das coletas dos espécimes biológicos.

3.3.1 Estudo Histopatológico e Imunohistoquímico

3.3.1.1 Alterações histológicas

A análise histopatológica da infecção experimental com pintos recém nascidos (*Gallus gallus domesticus*) demonstrou reação tecidual predominante no fígado e pulmão, seguido de alteração leve no rim e cérebro. O espectro de lesão mostrou variação de intensidade entre 1º ao 7º dia p.i., com pico de intensidade entre o 5º e 6º dia p.i. nos diferentes órgãos acometidos e, principalmente, para os dois órgãos alvo: pulmão e fígado. Não houve diferenciação das alterações patológicas nos órgãos analisados em relação às duas vias de inoculação (i.c. e s.c.), com exceção do tecido neural, que apresentou alteração apenas após infecção pela via i.c.

As alterações pulmonares foram caracterizadas por congestão, edema, espessamento das trabéculas pulmonares, hemorragia e infiltração

inflamatória de mononucleares (linfócitos e plasmócitos) de padrão intersticial, sem presença de exsudato intra alveolar e sem necrose intensa (Figura 11 B e C). A intensidade das lesões nos diferentes dias p.i. foi crescente a partir do 1º e 2º dia p.i., acentuando-se após o 3º dia p.i., com pico no 5º e 6º dia p.i.

As alterações do parênquima hepático foram caracterizadas pela presença de tumefação de hepatócitos, com início no 2º dia p.i. Os espaços-porta mostraram infiltrado inflamatório de mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) de leve a moderada intensidade, acompanhado de congestão local, principalmente entre o 5º e 6º dia p.i. (Figura 12 B e C). Aspectos regenerativos hepatocitários, colestase, fibrose e subversão da arquitetura lobular não foram observados.

No coração não foram observadas alterações significativas de nota. O baço apresentou eminentemente congestão, sem outras particularidades. Já no SNC, as alterações foram observadas apenas no grupo de animais inoculados pela via i.c., estando localizadas nas meninges e caracterizadas por edema e congestão, observadas principalmente entre o 5º e 6º dia p.i. Não foi observada meningite em nenhum dos grupos infectados. Nos rins, não foram observadas alterações significativas do parênquima renal e, quando estas estavam presentes, eram constituídas por congestão e leve infiltração de linfócitos no interstício, o que também foi observado nos animais do grupo controle. Os glomérulos não apresentaram alterações. Foi observada tumefação de células tubulares renais de leve intensidade, sobretudo entre o 6º e 7º dia p.i. (Figura 13).

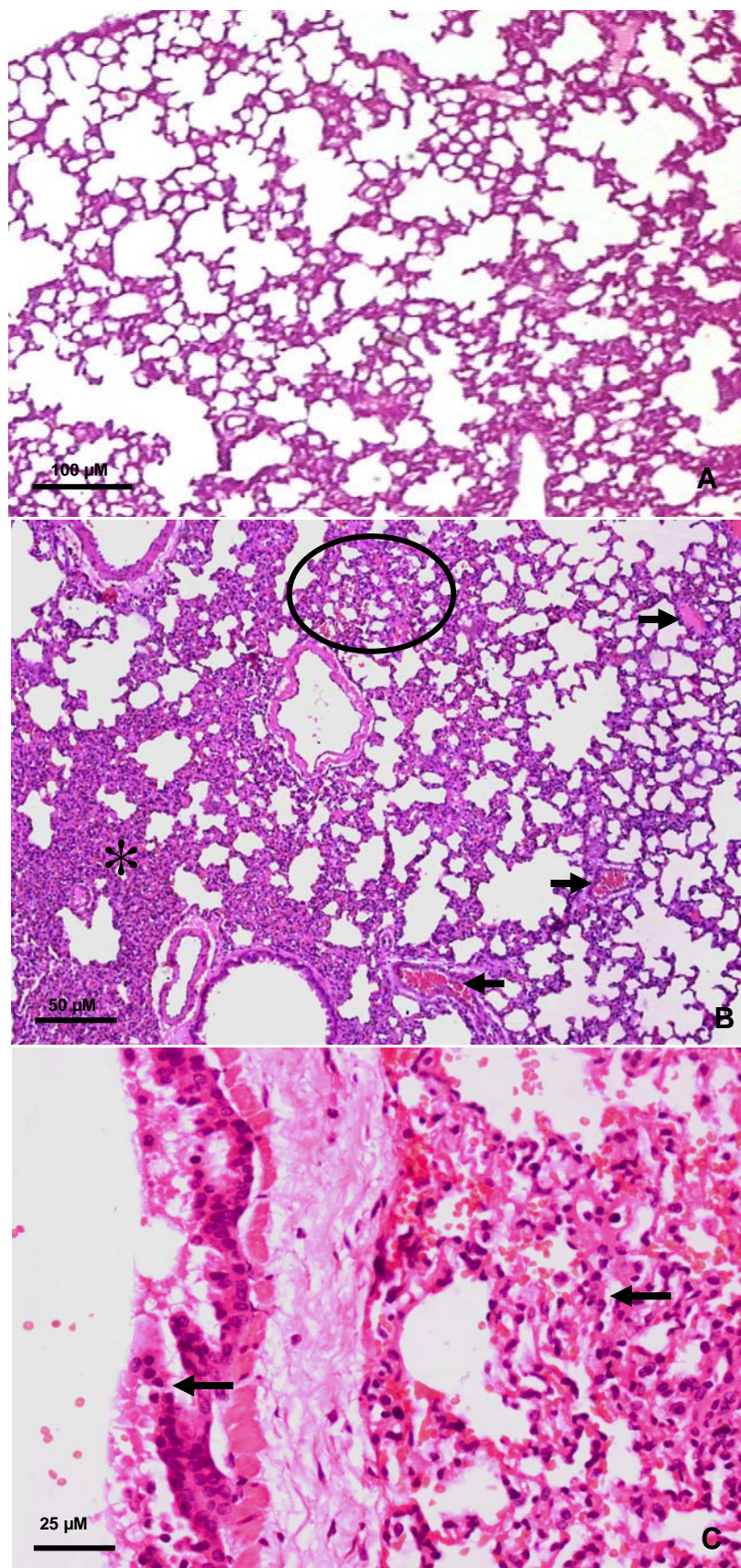


Figura 11 – Fotomicrografia de campo claro (HE) de tecido pulmonar de pinto da espécie *Gallus gallus domesticus*, controle (A) e infectado com a cepa do VGAM Be AN 439546 pela via s.c., no 7º dia p.i., mostrando hemorragia (círculo), congestão de vasos (setas) e espessamento das trabéculas pulmonares (*) (B); e infiltrado inflamatório - setas (C).

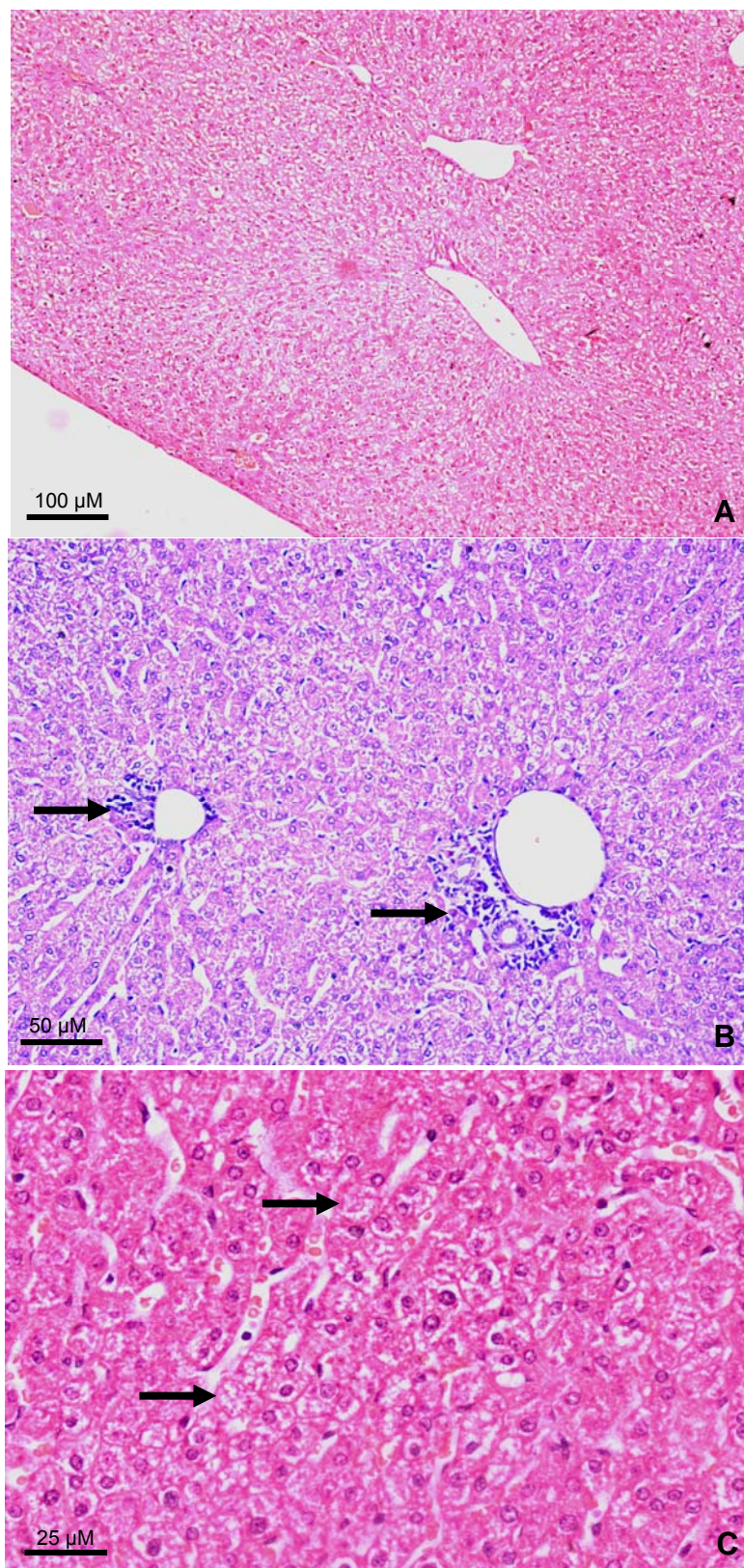


Figura 12 – Fotomicrografia de campo claro (HE) de tecido hepático de ave da espécie *Gallus gallus domesticus* controle (A) e infectado com a cepa do VGAM Be AN 439546 pela via s.c., no 7º dia p.i., mostrando infiltrado inflamatório perivascular – setas (B) e tumefação de hepatócitos – setas (C).

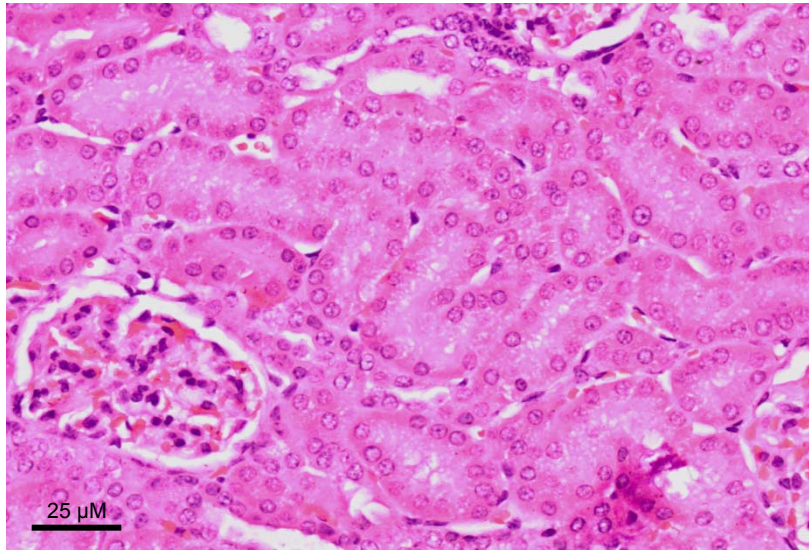


Figura 13 – Fotomicrografia de campo claro (HE) de tecido renal de ave da espécie *Gallus gallus domesticus* infectado com a cepa do VGAM Be AN 439546, pela via s.c., no 7º dia p.i., demonstrando tumefação das células dos túbulos renais.

3.3.1.2 Detecção de antígenos para o VGAM em tecidos de pintos (*Gallus gallus domesticus*)

A análise após a reação de imunohistoquímica nos tecidos de pintos recém nascidos infectados com o VGAM demonstrou imunorreatividade bem evidente no fígado e pulmão, com imunomarcção viral acastanhada característica distribuída no citoplasma das células (Figura 14 A e B). O antígeno viral foi observado a partir do 1º dia até o 8º dia p.i., com pico de intensidade no 7º dia p.i. Foi também observada imunoreação tecidual no rim (Figura 14C), embora a alteração patológica observada tenha sido leve. No baço, coração e cérebro a imunomarcção foi muito discreta e em raras células (Dados não mostrados).

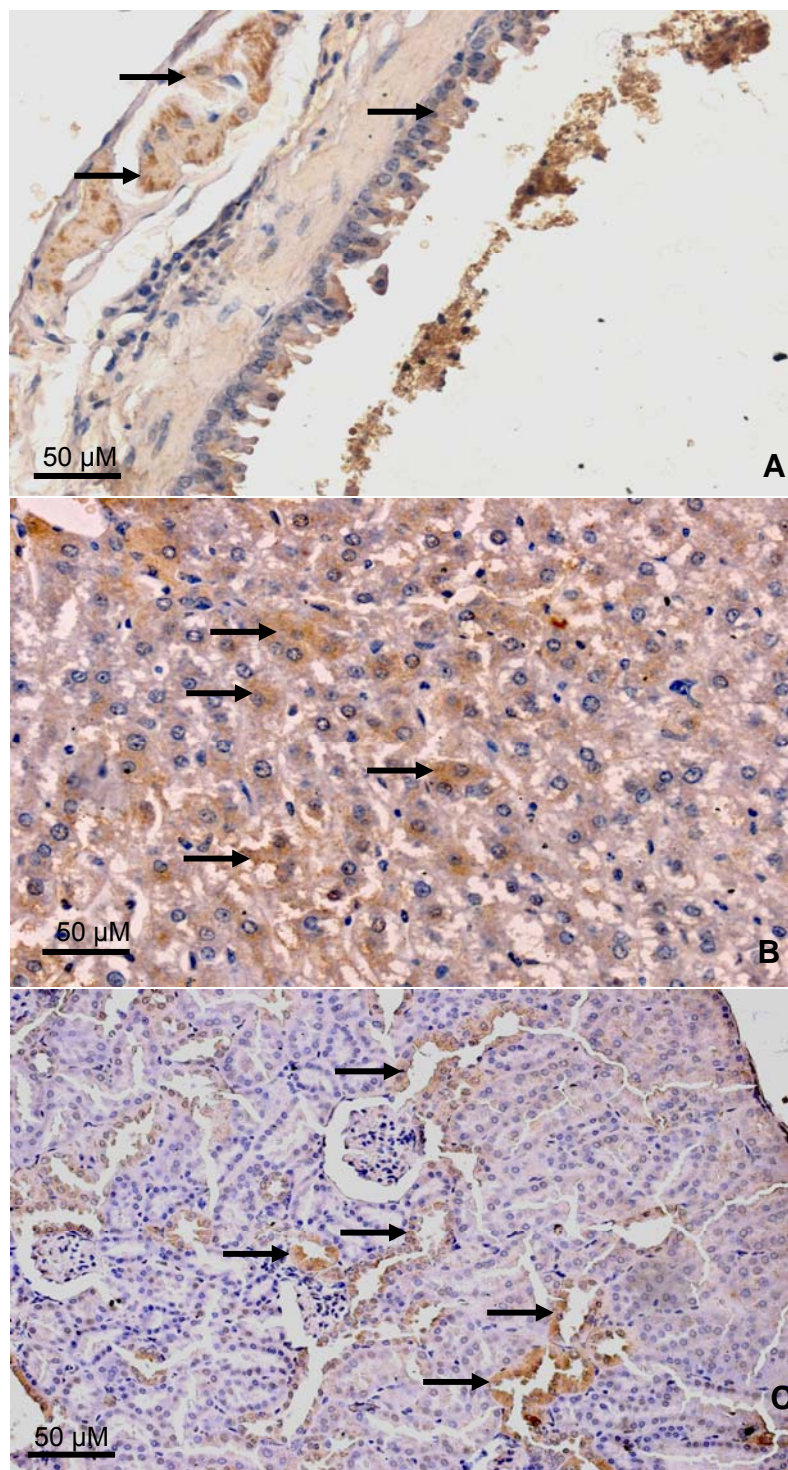


Figura 14 – Fotomicrografia de campo claro (imunohistoquímica) de amostras teciduais de ave da espécie *Gallus gallus domesticus* infectada com a cepa do VGAM Be AN 439546 pela via s.c., no 7º dia p.i. A – Imunomarcção acastanhada no citoplasma de células de tecido pulmonar (setas); B – tecido hepático mostrando hepatócitos imunomarcados (setas); C – tecido renal mostrando o citoplasma de células de túbulos renais imunomarcadas (setas).

3.4 ESTUDO SOROLÓGICO

3.4.1 Detecção de anticorpos Inibidores da Hemaglutinação

Dos plasmas de aves e soros de outros animais silvestres e de humanos procedentes de Tucuruí testados por IH para a pesquisa de anticorpos contra o VGAM, 37 (5,9%), 06 (2,6%) e 06 (1,5%) amostras, respectivamente, apresentaram anticorpos inibidores da hemaglutinação para o VGAM (Figura 15). Os títulos variaram de 1:20 a 1:640 (Quadro 10).

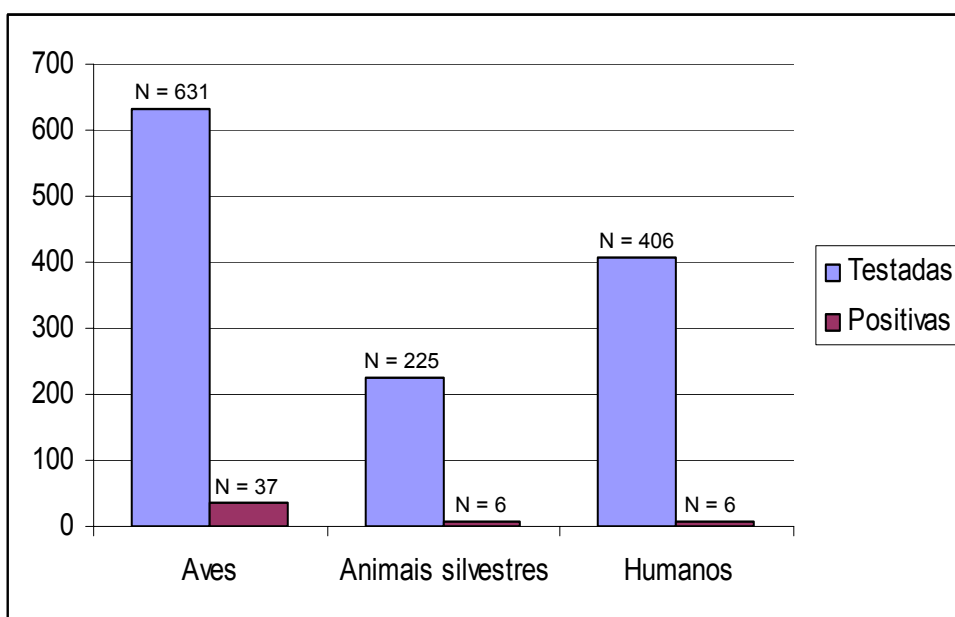


Figura 15 – Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação em amostras de plasma de aves, soros de outros animais silvestres (répteis, roedores, marsupiais, primatas não humanos, edentados e carnívoros) e de humanos coletados no município de Tucuruí, estado do Pará.

As 37 aves que apresentaram anticorpos para o VGAM são de espécies variadas, estando distribuídas em 12 famílias, sendo a ave da espécie *Ramphocelus carbo* (família Emberizidae, sub-família Thraupinae) a que apresentou maior positividade, com sete amostras apresentando anticorpos para o VGAM. Em seguida, encontramos a espécie *Saltator maximus* (família Emberizidae, sub-família Cardinalinae), com quatro amostras apresentando anticorpos inibidores da hemaglutinação. No quadro 10 estão descritas todas as 37 aves que apresentaram anticorpos para o VGAM, com seus respectivos valores de título no teste de IH.

Dos seis animais silvestres positivos no teste de IH, quatro são répteis com título de 1:40 a 1:160 e dois são roedores com títulos de 1:20 e 1:40. Dos répteis positivos, três eram da espécie *Chelonoidis denticulata* e um *Chelonoidis carbonaria*, conhecidos vulgarmente como jabuti tinga e jabuti piranga, respectivamente. Já os roedores positivos, um era da espécie *Dasyprocta aguti* (cutia) e outro da espécie *Proechimys guyannensis* (rato do campo). Das seis (1,5%) amostras de humanos que apresentaram anticorpos inibidores da hemaglutinação para o VGAM, os títulos variaram de 1:20 a 1:80.

Quadro 10 – Distribuição das aves de acordo com espécie, família e nome vulgar, que apresentaram anticorpos para o VGAM no teste de IH com seus respectivos títulos.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	NOME VULGAR	SEXO*	QUANT	TÍTULO IH
Alcedinidae	<i>Chloroceryles aenea</i>	Arirambinha	F	1	1:40
Caprimulgidae	<i>Chordeiles acutipennis</i>	Bacurau-de-asa-fina	1M/1F	2	1:20/1:20
Caprimulgidae	<i>Caprimulgus nigrescens</i>	Bacurau-de-lajeado	1M/1F	2	1:40/1:80
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	1M/1F	2	1:80/1:80
Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus picus</i>	Arapaçu-de-bico-branco	F	1	1:160
Dendrocolaptidae	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	Arapaçu-pardo	2M/1F	3	1:20/ 1:40/1:40
Emberizidae	<i>Thraupis episcopus</i>	Sanhaço-da-Amazônia	F	1	1:20
Emberizidae	<i>Ramphocelus carbo</i>	Pipira-vermelha	6M/1F	7	1:40/1:20/1:20/1:40/1:20/1:40/1:20
Furnariidae	<i>Automulus infuscato</i>	Barraqueiro-pardo	M	1	1:320
Furnariidae	<i>Philydor erythrocerus</i>	Limpa-folha-de asa-castanha	2F	2	1:20/1:20
Furnariidae	<i>Synallaxis rutilans</i>	João-teneném-castanho	M	1	1:160
Pipridae	<i>Pipra fasciicauda</i>	Uirapuru-laranja	1F	1	1:20
Ramphastidae	<i>Ramphastos vitellinus</i>	Tucano-de-bico-preto	1M/1F	2	1:20/1:160
Emberizidae	<i>Saltator maximus</i>	Tempera-viola	3M/1F	4	1:20/1:80/1:40/1:40
Thraupidae	<i>Tachyphonus rufus</i>	Pipira-preta	1M/1F	2	1:640/1:320
Tityridae	<i>Pachyramphus rufus</i>	Caneleiro-cinzento	F	1	1:320
Troglodytidae	<i>Campylorhynchus turdinus</i>	Garrinchão	1M/1F	2	1:160/1:40
Tyrannidae	<i>Myiarchus tuberculifer</i>	Maria-cavaleira-pequena	F	1	1:20
Tyrannidae	<i>Attila cinnamomeus</i>	Tinguaçu-ferrugem	F	1	1:20

* F: Fêmea; M: macho

Dos 37 plasmas de aves silvestres que apresentaram anticorpos para o VGAM (cepa brasileira Be AN 439546) no teste de IH, foi realizado o TN em apenas três amostras: *Pipra fasciicauda*, *Saltator maximus* e *Columbina talpacoti*, uma vez que as demais foram insuficientes para o desenvolvimento do teste. Dos três plasmas testados, dois (*Pipra fasciicauda* e *Columbina talpacoti*) neutralizaram o VGAM (cepa brasileira Be AN 439546) com ILN de 1,9 e 2,1 $DL_{50}/0,02mL$, respectivamente. Já dos seis soros dos outros animais silvestres positivos no teste de IH, apenas para a amostra do roedor *Proechimys guyannensis* não foi realizado o TN (também por apresentar quantidade de soro insuficiente), sendo que nenhuma delas neutralizou o VGAM (cepa brasileira Be AN 439546). O mesmo resultado foi observado para os seis soros humanos positivos para anticorpos inibidores da hemaglutinação.

Para as amostras de soro dos pintos coletadas durante a cinética do estudo experimental, foram detectados anticorpos para o VGAM a partir do 10º dia p.i. até o último dia do experimento (18º dia) nas duas vias de inoculação testadas (i.c e s.c), porém títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação mais elevados foram observados para a via i.c. (Figura 16).

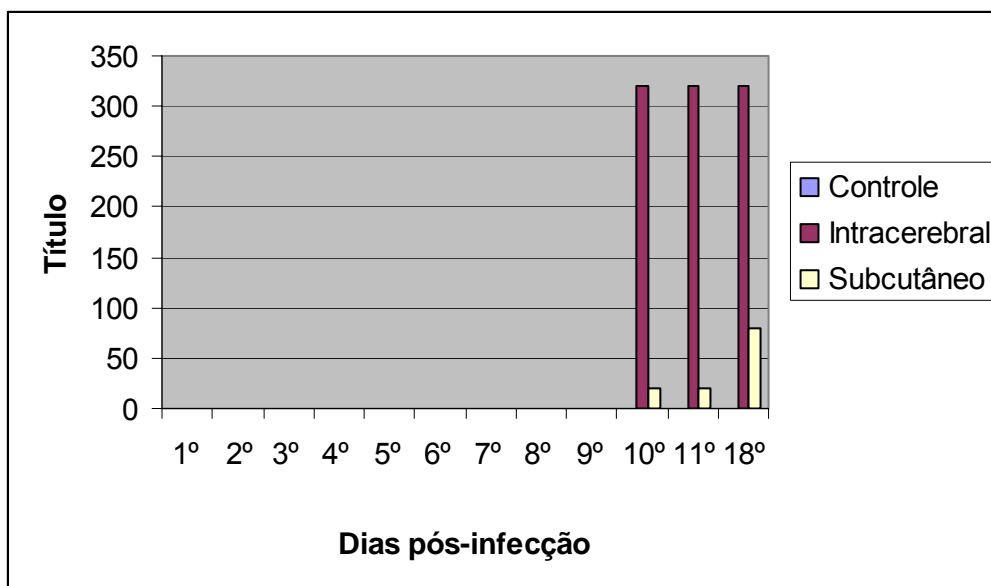


Figura 16 – Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação em amostras de soro de pintos (*Galus galus domesticus*) infectados com a cepa viral BE AN 439546 do VGAM, através das vias i.c. e s.c.

3.4.2 Relação antigênica em Teste de Fixação do Complemento

Em testes de FC cruzado com dez das 12 cepas brasileiras de VGAM, foi possível observar o relacionamento antigênico entre as cepas virais. A amostra protótipo brasileira do VGAM (Be AN 439546) apresentou uma relação específica mais intensa com as cepas Be AR 474122, Be AR 502068, Be AR 502380, Be AR 510329 e Be AR 510340, com títulos de $\geq 64/8$. Já os dois isolamentos obtidos de aves (Be AN 439546 e Be AN 448848) parecem ser um pouco mais distintos um do outro, com títulos de $8/8$ e $16/\geq 8$, respectivamente. Parece também existir diferenças antigênicas bem relevantes entre as cepas obtidas de artrópodes, como por exemplo, entre a cepa Be AR 502068 e Be AR 510690 em que não ocorreu reação entre a primeira amostra

e o soro homólogo da segunda amostra, assim como entre o antígeno dessa última cepa com o soro homólogo da amostra Be AR 502068 em que foi observada apenas uma reação com título de 8/4, assim como outros exemplos que podem ser observados no quadro 11, onde estão representados todos os resultados obtidos nos testes cruzados de FC.

Quadro 11 – Resultados dos testes cruzados de fixação do complemento com amostras de vírus do grupo Gamboa, isoladas na área de Tucuruí, nos anos de 1982 a 1988.

ANTÍGENOS	SOROS										
	546	848	712	122	068	380	329	340	690	527	Controle
AN 439546	≥64/8	8/8	8/4	16/8	8/4	≥64/8	32/4	16/8	32/4	≥64/8	0
AN 448848	16/≥8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	0
AR 470712	8/8	16/8	32/8	≥64/8	8/4	8/4	≥64/8	16/8	16/8	16/8	0
AR 474122	≥64/8	≥64/8	8/8	64/8	≥64/8	≥64/8	16/8	≥64/8	≥64/8	4/8	0
AR 502068	≥64/8	0	8/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	4/8	8/8	0	8/8	0
AR 502380	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	0
AR 510329	≥64/8	0	8/8	8/8	64/8	≥64/8	≥64/8	8/8	0	4/8	0
AR 510340	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/3	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	≥64/8	0
AR 513690	8/≥8	8/8	8/4	32/4	8/4	16/8	16/8	≥64/8	16/8	16/8	0
AR 514527	32/4	≥64/8	16/4	8/4	64/8	32/4	32/4	≥64/8	32/8	32/4	0
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda – Valores destacados na cor vermelha: título das cepas virais e seus respectivos soros homólogos; em azul: cepas que apresentaram maior relação antigênica entre si; em verde: relação antigênica entre as duas amostras isoladas do sangue de aves; em rosa: amostras que apresentaram baixa relação antigênica entre si.

4 DISCUSSÃO

A viabilidade das doze cepas de VGAM nos camundongos albinos suíços recém nascidos e na linhagem celular VERO, demonstra mais uma vez a excelente suscetibilidade desses dois sistemas de isolamento viral para a replicação de arbovírus, classificando, principalmente, os camundongos albinos suíços recém nascidos, como o melhor e mais eficiente sistema de isolamento ainda disponível para esse grupo de vírus (Dias, 1986; Travassos da Rosa, *et al.*, 1997; Azevedo, *et al.*, 2007).

A variação no tempo de início de doença nos camundongos recém nascidos e do início de aparecimento de ECP nas células VERO (quadro 8), demonstra a diferença entre um sistema de isolamento “in vivo” e “in vitro”, uma vez que os cultivos celulares não apresentam ainda que imaturo o sistema imunológico e fisiológico dos animais recém nascidos utilizados para o estudo com arbovírus, o que provavelmente permite que o vírus inicie a sua replicação mais rapidamente, como foi observado para as doze cepas virais de VGAM, as quais apresentaram um tempo menor para o início do aparecimento do ECP nas células VERO, como por exemplo a amostra Be AR 502380 que causou ECP em células VERO no 3º dia p.i. enquanto os camundongos recém nascidos adoeceram no 10º dia p.i.

A característica do ECP observada para as cepas brasileiras de VGAM utilizadas neste estudo em células VERO (Figura 8), foi semelhante ao observado para outros orthobunyavírus como os *Vírus Mojui dos Campos* (Wanzeller *et al.*, 2002) e VLAC (Bennett *et al.*, 2007), sendo também caracterizado por destruição da monocamada celular, devido a morte das

células, com arredondamento das mesmas, assim como observado para as amostras em estudo (Figura 8).

Quanto ao estudo molecular dos vírus do sorogrupo Gamboa, as sequências nucleotídicas obtidas estão de acordo com o que era esperado para o par de iniciadores utilizados - M14C e M619R, os quais foram desenhados para amplificar o gene Gn do segmento M dos orthobunyavírus (Fulhorst *et al.*, 1996). Também observou-se que os 450 nucleotídeos consensos obtidos para esses vírus corroboram o que é descrito na literatura para esta região do segmento M dos orthobunyavírus (Lees *et al.*, 1986; Nichol *et al.*, 2005; Elliott, 2008). A amostra viral Be AR 502068 foi excluída do estudo molecular devido, provavelmente, a quantidade obtida de cDNA da amostra ter sido insuficiente para a leitura pelo sequenciador, uma vez que o RNA da amostra foi obtido e o cDNA amplificado (Figura 9). Novas tentativas de obtenção da sequência nucleotídica dessa amostra serão realizadas.

A árvore filogenética gerada pelo método de MV para os vírus em estudo em comparação com outros orthobunyavírus exibiu valores de *bootstrap* e de probabilidade posterior confiáveis, entretanto alguns valores relativamente baixos para alguns ramos da árvore foram observados, principalmente para o grupo Bunyamwera (65,8 % e 70 %) e podem ter ocorrido em virtude da elevada variabilidade genética observada para o segmento M entre vírus de sorogrupos diferentes, como, aliás, foi anteriormente observado por Briese e colaboradores (2004) e Carvalho e colaboradores (2009) em estudos com os VGRA e *Vírus Melao* (VMEL), respectivamente.

O estudo comparativo dos vírus do grupo Gamboa com outros orthobunyavírus dos grupos Bunyamwera, Califórnia, Simbu e Turlock, evidenciou que os vírus em estudo são geneticamente mais relacionados com o *Vírus Umbre* (VUMB) do grupo Turlock e menos com os vírus do grupo Simbu. O grupo Turlock é conhecido por conter vírus que possuem ciclo de manutenção envolvendo mosquitos como vetores e aves como hospedeiros vertebrados, principalmente, o *Vírus Turlock* (protótipo do grupo) e o VUMB (Yadav *et al.*, 2008), característica essa também observada para os vírus do sorogrupo Gamboa. Isto talvez explique, em parte, esse relacionamento filogenético.

A distribuição dos vírus do sorogrupo Gamboa utilizados neste estudo em dois grupos filogenéticos distintos (clado I e clado II) está de acordo com a atual classificação sorológica, na qual os vírus do grupo Gamboa são divididos em dois complexos antigênicos: Gamboa e Alajueta (Figura 5) (Calisher *et al.*, 1981; Calisher, 1996), de modo que o clado I corresponde ao complexo Gamboa, pois nesse clado está incluído os VGAM e VPV que fazem parte do complexo Gamboa; e o clado II ao complexo Alajueta, uma vez que contém os VSJ e VBL deste complexo antigênico. Faz parte ainda deste último complexo o VALJ, que não foi incluído em nosso estudo devido à indisponibilidade da amostra viral para a obtenção da sequência nucleotídica. Acreditamos que esse vírus, provavelmente, faria parte do clado II, uma vez que os outros vírus relacionados a ele dentro do complexo Alajueta, os VSJ e VBL, como descrito sorologicamente (Calisher *et al.*, 1981) estão nesse clado.

Em estudos posteriores pretendemos incluir esse vírus na análise para tentar confirmar essa hipótese.

Todas as onze amostras brasileiras de VGAM foram incluídas no clado I, estando, portanto, mais relacionadas aos VGAM e VPV, sendo provavelmente cepas desses dois vírus, como também observado para a cepa TR61469 isolada no Suriname. Esses achados nos levam a acreditar que possivelmente no Brasil (principalmente no lago da usina hidroelétrica de Tucuruí, no Pará) só exista a circulação de vírus do complexo Gamboa, uma vez que até o momento não existem evidências de isolamentos de vírus relacionados aos vírus do complexo Alajuela. Já a subdivisão observada para o clado II (subclado II-a e subclado II-b), demonstra existir diferenças genéticas significativas ao nível do gene Gn entre os VBL e VSJ, separando esses vírus em duas linhagens diferentes dentro do complexo Alajuela.

A baixa divergência nucleotídica e aminoacídica observada entre as 11 cepas brasileiras de VGAM, ao nível do gene Gn, se deve provavelmente por essas amostras terem sido isoladas no mesmo local de origem (Tucuruí – Pará) e mesmo período (1986 a 1988). Já as amostras latinoamericanas foram isoladas de países diferentes, como Panamá, Honduras, Equador e Suriname, e em períodos diferentes (1962 a 1987), fato este que vem provavelmente justificar a divergência nucleotídica de 62,7 % observada entre esses vírus.

A ave doméstica da espécie *Gallus gallus domesticus* é frequentemente utilizada como animal sentinela (Chung, 1970) e em estudos de infecções experimentais com arbovírus, sendo que em geral, esses animais desenvolvem viremia e soroconversão, porém não apresentam sintomatologia

clínica, assim como foi observado para o VGAM cepa brasileira Be AN 439546 neste estudo e para os flavivirus *Vírus do Nilo Ocidental* (VNO), *Vírus da Encefalite de Murray Valley* (VEMV), *Vírus da Encefalite Saint Louis* (VESL) e o *Vírus Usutu* (VUSU) (Smith *et al.*, 1947, Chung, 1970, Senne *et al.*, 2000, Langevin *et al.*, 2001, Chvala *et al.*, 2004; 2005).

As alterações patológicas observadas durante a infecção experimental com o VGAM em tecidos de pintos recém nascidos no pulmão e fígado os caracterizam como órgãos alvos para a replicação do VGAM, sendo confirmado através da detecção de antígenos virais através da imunohistoquímica. Os dados obtidos do experimento mostram inclusive que o pulmão é o órgão mais afetado. Por outro lado, lesões observadas no SNC ao nível das meninges apenas no grupo de animais infectados pela via i.c. possivelmente ocorreu devido ao trauma causado durante o procedimento de inoculação da amostra viral, o que se confirmado, excluiria o cérebro como órgão alvo durante infecções com o VGAM. O mesmo observou-se para coração e baço, uma vez que a imunomarcagem nesses tecidos foi muito tênue ou inexistente e praticamente não observou-se alterações histológicas nos mesmos.

Já para o rim, a marcação observada por imunohistoquímica no citoplasma das células dos túbulos renais (Figura 13) comprova a presença de antígeno do VGAM nesse tecido, indicando que esse vírus replica-se nas células renais, apesar de causar alteração tecidual leve nos exames histopatológicos. Esse fato tem sido bastante observado em estudos de infecção persistente com os VNO (Tonry *et al.*, 2005; Tesh *et al.*, 2005) e VESL

(Siirin *et al.*, 2007), onde os autores demonstraram que esses vírus causam infecção renal crônica com persistente liberação de partículas virais pela urina em hamsters dourados jovens (*Mesocricetus auratus*), porém exibem poucas alterações anatomopatológicas à microscopia.

O tropismo acentuado desse vírus pelo tecido pulmonar é uma característica que até o momento não foi relatada entre os vírus do gênero *Orthobunyavirus*, consistindo achado novo entre os orthobunyavirus com patologia descrita, uma vez que a maioria desses vírus apresenta alterações teciduais predominantes no SNC e/ou fígado, sendo que outros órgãos quando acometidos o são com intensidade leve a moderada (Karabatsos, 1985, Dias, 1986). De fato, assim foi observado por De Paola e colaboradores (1963) em um estudo sobre a infecção experimental com vírus do grupo C e Guamá em camundongos jovens e adultos e também por Araújo e colaboradores (1978) quando inocularam o VORO em hamsters.

O tropismo pulmonar dentro da família *Bunyaviridae* tem sido relatado apenas para os hantavírus que causam síndrome pulmonar em humanos (Vinh & Embil, 2009) e para o phlebovírus *Serra Norte*, que em um estudo desenvolvido por Ohashi e Brasil (1997), demonstraram certo tropismo desse vírus por tecido pulmonar de camundongo albino suíço recém nascido. Entretanto, nenhum estudo de infecção experimental com membros da família *Bunyaviridae* usando como modelo experimental a ave doméstica *Gallus gallus domesticus*, até onde podemos ver na literatura, foi realizado, sendo nossos achados novos para a ciência.

A detecção do antígeno do VGAM no pulmão e fígado de pintos recém nascidos por imunohistoquímica a partir do 1º ao 8º dia p.i. e a detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação nos soros desses animais a partir do 10º dia p.i. (Figura 12) caracteriza uma provável curva virêmica para a infecção do VGAM em ave da espécie *Gallus gallus domesticus*, apesar de não ter sido determinada a viremia no sangue dos pintos, para melhor estabelecer o curso da infecção e resposta imune do hospedeiro. Para determinar a curva viremica, o PCR em tempo real poderá ser utilizado para detectar o genoma viral nas amostras teciduais bem como quantificar a carga viral presente nos tecidos e no sangue.

Em relação ao estudo sorológico, a maior prevalência (5,9%) de anticorpos inibidores da hemaglutinação para o VGAM em amostras de plasma de aves silvestres em relação às amostras de soro de outros animais silvestres (2,6 %), corrobora os achados de Calisher e colaboradores (1981), que em um estudo de soroprevalência realizado na província de Santa Fé na Argentina encontrou 14,5 % de anticorpos neutralizantes para o VGAM em aves e 3,4 % para outros animais silvestres. Esses achados reforçam a hipótese de que as aves constituem o principal vertebrado hospedeiro de amplificação do VGAM. Essa característica, provavelmente, se deve ao fato de que os mosquitos *Aedeomyia squamipennis*, que é o principal vetor transmissor do VGAM, possuem hábitos noturnos e são tidos como dotados de predileção por sangue de aves – ou seja, são ornitofílicos (Forattini, 2002). Esse fato facilita o contato desses mosquitos com aves e, conseqüentemente, a transmissão do VGAM a esses animais.

Apesar das aves das espécies *Ramphocelus carbo* (Emberizidae - Thraupinae), conhecida vulgarmente como pipira-vermelha e a *Saltator maximus* (Emberizidae – Cardinalinae), nome vulgar tempera-viola, terem sido as espécies com maior prevalência de anticorpos para o VGAM, outras espécies de aves de outras famílias também apresentaram positividade para esse vírus em testes de IH, o que descarta a possibilidade do VGAM possuir suscetibilidade para sua replicação em uma única espécie ou família de ave. Achados semelhantes foram obtidos no estudo de Calisher e colaboradores (1981), onde diversas espécies de aves distribuídas em cinco famílias apresentaram anticorpos neutralizadores para o VGAM.

O TN confirmou a presença de anticorpos específicos para a cepa brasileira do VGAM Be AN 439546 no plasma de duas aves capturadas em Tucuruí no Estado do Pará, reforçando desta forma o papel desses animais no ciclo de manutenção do VGAM, assim como a provável circulação desse vírus nessa região na época da coleta das amostras.

Por outro lado, a negatividade no TN para os soros dos répteis, do roedor e dos humanos que apresentaram anticorpos inibidores da hemaglutinação, demonstrou que esses anticorpos são inespecíficos ou podem ser devido à reação cruzada com anticorpos para outros orthobunyavirus, já que as amostras não foram testadas para outros vírus desse gênero viral, uma vez que várias dezenas de bunyavirus circulam na Amazônia. A reatividade cruzada é característica bastante observada no teste de IH que é um teste sorológico que apresenta alta sensibilidade, porém exibe baixa especificidade, o que resulta em muitos cruzamentos sorológicos entre vírus de um mesmo

grupo antigênico e/ou gênero viral (Pinheiro *et al.*, 1996; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2007).

A relação antigênica observada entre as dez cepas brasileiras de VGAM com base em testes cruzados de FC (Quadro 11) foi diferente quando comparada com a relação dos valores percentuais de divergência nucleotídica e aminoacídicas das sequências obtidas para o gene Gn das 11 cepas brasileiras de VGAM (Tabela 1). De fato, pela sorologia alguns vírus apresentaram baixa relação antigênica, enquanto que pela análise genética do gene Gn esses vírus apresentam baixa divergência nucleotídica, ou seja, são bastante relacionados entre si. Essa diferença entre relação genética e antigênica pode ser explicada, muito provavelmente, pelo fato de que o teste de FC utiliza a reatividade da proteína N, codificada a partir do segmento S-RNA e a análise genética baseou-se em sequência do gene Gn do segmento M-RNA.

Muito embora a filogenia dos vírus do grupo Gamboa observada neste trabalho tenha se mostrado de acordo com a classificação sorológica atual, esta classificação é realizada não apenas baseada em teste de FC, mas também em testes de IH e TN, sendo que ambos os testes utilizam a reatividade das glicoproteínas de superfície Gn e/ou Gc (Beaty & Bishop, 1988; Calisher, 1996; Elliott, 2008). Diferenças das relações antigênicas observadas entre os métodos sorológicos clássicos (FC, IH e TN) para orthobunyavírus vêm sendo descritos na literatura (Shope & Causey, 1962; Shope *et al.*, 1988) e tem sido comprovado geneticamente que essas diferenças são devido a rearranjos entre os segmentos, tal como foi observado para os VORO

(Vasconcelos, 2009), VMEL (Carvalho *et al.*, 2009) e os vírus do grupo C (Nunes *et al.*, 2005). Contudo, estudos moleculares para o segmento S-RNA ou o genoma completo dos vírus do grupo Gamboa, bem como a realização de testes de IH e neutralização com esses vírus são fundamentais para tentar elucidar essas questões.

Os achados deste trabalho representam as primeiras informações sobre a relação genética entre os vírus do sorogrupo Gamboa e outros orthobunyavirus ao nível do segmento M-RNA, e sobre a patogenicidade da cepa brasileira do VGAM Be AN 439546 em pintos da espécie *Gallus gallus domesticus*. Este estudo também vem reforçar os dados sorológicos e epidemiológicos já existentes sobre o ciclo de replicação dos vírus do grupo antigênico Gamboa em natureza, principalmente, do VGAM. Muitos outros estudos ainda devem ser realizados para melhor compreender a biologia molecular desses vírus, inclusive com o sequenciamento parcial ou completo dos demais segmentos genômicos (S-RNA e L-RNA) para estudar possíveis rearranjos genéticos, assim como estudos adicionais sobre a ecoepidemiologia, principalmente do vírus em relação ao vetor artrópode, bem como sobre a patogenicidade em outros modelos experimentais.

5 CONCLUSÕES

- Os camundongos albinos suíços recém nascidos e as células VERO são suscetíveis à replicação dos vírus do sorogrupo Gamboa;
- As sequências nucleotídicas obtidas para os vírus do sorogrupo Gamboa são compatíveis com o gene da glicoproteína de superfície Gn do segmento M-RNA dos orthobunyavirus;
- As 11 cepas brasileiras de VGAM são geneticamente muito semelhantes, com elevada homologia entre si ao nível da glicoproteína de superfície Gn (segmento M-RNA), enquanto as demais cepas latinoamericanas são menos relacionadas entre si;
- Os vírus do grupo Gamboa são, ao nível do gene Gn, filogeneticamente mais relacionados aos vírus do grupo Turlock e menos relacionados aos vírus do grupo Simbu;
- Filogeneticamente, em relação ao segmento M-RNA (Glicoproteína Gn) os vírus do sorogrupo Gamboa foram divididos em dois clados distintos (clado I e clado II), de modo semelhante ao observado para a classificação sorológica atual, em dois complexos antigênicos;
- A ave doméstica *Gallus gallus domesticus* mostrou-se suscetível à replicação da cepa brasileira do VGAM Be AN 439546, desenvolvendo viremia e resposta

imune com produção de anticorpos, sem apresentar sinais clínicos aparentes de doença;

- A cepa brasileira do VGAM Be AN 439546 apresentou tropismo predominante para os tecidos pulmonares e hepáticos de pintos recém nascidos da espécie *Gallus gallus domesticus*;

- O tropismo predominante por tecido pulmonar pela cepa do VGAM Be AN 439546 é um achado novo entre os orthobunyavírus com patologia descrita;

- Estudos moleculares com sequenciamento completo do genoma completo dos vírus do sorogrupo Gamboa, assim como sobre a ecoepidemiologia do vetor e de animais hospedeiros (especialmente aves) para o ciclo de replicação dos vírus, são importantes para uma melhor compreensão da epidemiologia molecular, reforçando as informações já existentes sobre esses vírus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, H., BISHOP, D. H. Comparison of the sequences and coding of La Crosse and snowshoe hare bunyavirus S RNA species. **Journal of virology** **45**: p. 1155 – 1158, 1983.

AKASHI, H., GAY, M., IHARA, T., BISHOP, D. H. Localized conserved regions of the S RNA gene products of bunyaviruses are revealed by sequence analyses of the Simbu serogroup Aino virus. **Virus Research**, **1**: p. 51 – 63, 1984.

ARAÚJO, R., DIAS, L. B., ARAÚJO, M. T. F., PINHEIRO, F., OLIVA, O. F. P.. Alterações ultraestruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (Tipo Be AN 19991). **Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo**, **20 (1)**: 45 – 54, 1978.

AZEVEDO, R. S. S., MARTINS, L. C., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: **Infectologia Pediátrica**. Farhat, C. K., Carvalho, L. H. F. R., Succi, R. C. M. (eds). 3ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2007. p 533 – 551.

BEATY, B. J., BISHOP, D. H. Bunyavirus-vector interactions. **Virus Research**, **10**: p. 289 – 301, 1988.

BEATY, B.J., CALISHER, C.H., SHOPE, R.E. Arboviruses. In: **Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections**. Schmidt NJ, Emmons RW (ed.). Washington, American Public Health Association, 1989 p. 797 – 855.

- BEATY, B. J., CALISHER, C. H., SHOPE, R. E. Arboviruses. In: **Diagnostic procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial infections**. Lennette, E. H., Lennette, D. A., Lennette, E. T. (eds). 7^a edição, American Public Health Association, Washington, DC, 1995. p 189 – 212.
- BENNETT, R. S., TON, D. R., HANSON, C. T., MURPHY, B. R., WHITEHEAD, S. S.. Genome sequence analysis of La Crosse virus and *in vitro* and *in vivo* Phenotypes. **Virology Journal**, **4:41**: p. 1 – 10, 2007.
- BISHOP, D. H. L.; SHOPE, R. E. Bunyaviridae, in **Comprehensive Virology**, Fraenkel-Contrat, H. and Wagner, R. R.(eds). Plenum Press, New York, 1979. p. 1151 – 1160.
- BISHOP, D. H., CALISHER, C. H., CASALS, J., CHUMAKOV, M. P., GAIDAMOVICH, S. Y., HANNOUN, C., LVOV, D. K., MARSHALL, I. D., OKER-BLOM, N., PETERSSON, R. F., PORTERFIELD, J. S., RUSSELL, P. K., SHOPE, R. E., WESTAWAY, E. G. *Bunyaviridae*. **Intervirology**, **14**: p. 125 – 143, 1980.
- BISHOP, D. H. L. Biology and Molecular Biology of Bunyaviruses: In: **The Bunyaviridae** (R. M. Elliott, ed.). Plenum Press, New York, 1996. p. 19 – 53.
- BOWEN, M. D., JACKSON, A. O., BRUNS, T. D., HACKER, D. L., HARDY, J. L. Determination and comparative analysis of the small RNA genomic sequences of California encephalitis, Jamestown Canyon, Jerry Slough, Melao, Keystone and Trivittatus viruses (Bunyaviridae, genus Bunyavirus, California serogroup). **The Journal of General Virology**, **76 (Pt3)**: p. 559 – 572, 1995.

- BOWEN, M. D., TRAPPIER, S. G., SANCHEZ, A. J., MEYER, R. F., GOLDSMITH, C. S., ZAKI, S. R., DUNSTER, L. M., PETERS, C. J., KZIAZEK, T. G. & NICHOL, S. T. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. **Virology**, **291**: p. 185 – 190, 2001.
- BRIDGEN, A., WEBER, F., FAZAKERLEY, J. K., ELLIOTT, R. M. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **98**: p. 664 – 669, 2001.
- BRIESE, T., RAMBAUT, A., LIPKIN, W. I. Analysis of the medium (M) segment sequence of *Guaroa virus* and its comparison to other orthobunyavirus. *Journal of General Virology*, **85**: 3071 – 3077, 2004.
- CALISHER, C. H., LAZUICK, J. S., JUSTINES, J., FRANCY, D. B., MONATH, T. P., GUTIERREZ, E., SABATTINE, M. S., BOWEN, G. S., JAKOB, W. L. Viruses Isolated from *Aedeomyia squamipennis* mosquitoes collected in Panama, Ecuador and Argentina: Establishment of the Gamboa Serogroup. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **30(1)**: p. 219 – 223, 1981.
- CALISHER, C. H. Taxonomy, classification, and geographic distribution of California serogroup bunyaviruses. **Progress in Clinical and Biological Research**, **123**: p. 1 – 16, 1983.
- CALISHER, C. H., GUTIERREZ, E., FRANCY, D. B., ALAVA, A. A., MUTH, D. J., LAZUICK, J. S. Identification of Hitherto Unrecognized Arboviruses from Ecuador: Members of Serogroups B, C, Bunyamwera, Patois, and

- Minatitlan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **32(4)**: p. 877 – 885, 1983.
- CALISHER, C. H., LAZUICK, J. S., SUDIA, D. W. Brus Laguna Virus, a Gamboa Bunyavirus from *Aedeomyia squamipennis* Collected in Honduras. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **39(4)**: p. 406 – 408, 1988.
- CALISHER, C. H. History, Classification, and Taxonomy of viruses in the Family *Bunyaviridae*: In: *The Bunyaviridae* (R. M. Elliott, ed.). Plenum Press, New York, 1996. p. 1 – 18.
- CAMPBELL, W. P., HUANG, C. Sequence comparisons of medium RNA segment among 15 California serogroup viruses. **Virus Research**, **61**: p. 137 – 144, 1999.
- CAMPBELL, G. L., MATA CZYNSKI, J. D., REISDORF, E. S., POWELL, J. W., MARTIN, D. A., LAMBERT, A. J., HAUPT, T. E., DAVIS, J. P., LANCIOTTI, R. S. Second human case of Cache Valley virus disease. **Emerging Infectious Diseases**, **12**: p. 854 – 856, 2006.
- CARVALHO, V. L., NUNES, M. R. T., SILVA, E. V. P., VIEIRA, C. M. A., GOMES M. S., CASSEB S. M., RODRIGUES, S. G., NETO, J. P. N., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. Genetic characterization of Orthobunyavirus Melao, strains BE AR633512 and BE AR8033 and experimental infection in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of General Virology**, v. **90**, p 223 – 233, 2009.
- CASALS, J. The Arthropod-borne group of animal viruses. **Transactions of the New York Academic Science**, **19**: p. 219 – 235, 1957.

- CASALS, J., WHITMAN, L. A new antigenic group of arthropod-borne viruses: the Bunyamwera group. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **9**: p. 73 – 77, 1960.
- CASALS, J. Immunological techniques for animals viruses. In: **Methods in Virology**. Maramorosh, K. & Koprowski, H. (eds.) New York, Academic Press, 3: 1967. p. 75 – 81.
- CHENG, L. L., SCHULTZ, K. T., YUILL, T. M., ISRAEL, B. A. Identification and localization of conserved antigenic epitopes on the G2 proteins of California serogroup Bunyaviruses. **Viral Immunology** **13**: p. 201 – 213, 2000.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, **162**: p. 156 – 159, 1987.
- CHOMEL, B. B., BELOTTO, A., MESLIN, F. X. Wildlife, Exotic pets, and Emerging Zoonoses. **Emerging Infection Diseases**, **Vol 13, N.º 1**: p. 06 – 11, 2007.
- CHUNG, Y.S. Viraemia and antibody responses in chickens infected with arboviruses. **Journal of Comparative Pathology**, **80**: p. 311 – 314, 1970.
- CHVALA, S., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., WEISSENBOÖCK, H. Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. **Journal of Comparative Pathology**, **131**: p. 176 – 185, 2004.

- CHVALA, S., BAKONYI, T., HACKL, R., HESS, M., NOWOTNY, N., WEISSENBOCK, H. Limited pathogenicity of Usutu virus for the domestic chicken (*Gallus domesticus*). **Avian Pathology**, **34(5)**: p. 392 – 395, 2005.
- CLARKE, D. H., CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **7**: p. 561 – 573, 1958.
- DE PAOLA, D., BRUNO-LOBO, M., DUARTE, F. Histopatologia experimental dos arbovírus do grupo C e Guamá. **Anais de Microbiologia**, **11 (Parte B)**: p. 133 – 160, 1963.
- DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C., HERVÉ, J. P., SÁ FILHO, G. C., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., RODRIGUES, S. G. Modifications of Arbovirus Transmission in Relation to Construction of Dams in Brazilian Amazonia. **Ciência & Cultura**, **44**: p. 124 – 135, 1992a.
- DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., SILVA, J. M. C., RODRIGUES, S. G., VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., SILVA, G. P., SILVA, R. P. As aves como hospedeiras de arbovírus na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Zoologia**, **8**: p. 69 – 111, 1992b.
- DIAS, L.B. Patologia natural e experimental de arbovírus e vírus correlatos isolados na Amazônia. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical**. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986, p. 439 – 450.

- DUNN, E. F., PRITLOVE, D. C., ELLIOTT, R. M. The S RNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway bunyaviruses: sequence determination and analysis. **The Journal of general virology 75 (Pt 3):** p. 597 – 608, 1994.
- DUTARY, B. E., PETERSEN, J. L., PERALTA, P. H., TESH, R. B. Transovarial Transmission of Gamboa Virus in a Tropical Mosquito, *Aedeomyia squamipennis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 40(1):** p. 108 – 113, 1989.
- DYAR, H. G. The mosquitoes of the Americas. **Washington, DC: Carnegie Institute of Washington**, 394, 1928.
- ELLIOTT, R. M. Molecular biology of the *Bunyaviridae*. **Journal of General Virology, 70:** p. 501 – 522, 1990.
- ELLIOTT, R. M. Emerging Viruses: The *Bunyaviridae*. **Molecular Medicine, Vol. 3, n.º 09:** p. 572 – 577, 1997.
- ELLIOTT, R. M., BOULOY, M., CALISHER, C. H., GOLDBACH, R., MOYER, J. T., NICHOL, S. T., PETTERSSON, R., PLYUSNIN, A., SCHMALJOHN, C. S. *Bunyaviridae*. In **Virus Taxonomy**. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press. 2000.
- ELLIOTT, R. M. Bunyaviruses: General Features. In: **Encyclopedia of Virology**. Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (Eds). Third edition. Elsevier Academic Press, San Diego, California. 2008. p. 391 – 399.
- ELLIOTT, R. M. Bunyaviruses and climate change. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 15:** p. 510 – 517, 2009.

- ENDRES, M. J., GRIOT, C., GONZALEZ-SCARANO, F., NATHANSON, N.
Neuroattenuation of an avirulent bunyavirus variant maps to the L RNA segment. **Journal of Virology**, **65**: p. 5465 – 5470, 1991.
- ESHITA, Y., BISHOP, D. H. The complete sequence of the M RNA of snowshoe hare bunyavirus reveals the presence of internal hydrophobic domains in the viral glycoprotein. **Virology**, **137**: p. 227 – 240, 1984.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, **39**: p. 783 – 791, 1985.
- FORATTINI, O. P. Tribo Sabethini. In: **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia e Epidemiologia**. Forattini, O.P. (ed). São Paulo, Edusp – Editora da Universidade de São Paulo. Volume2, 2002. p. 759 – 760.
- FULHORST, C. F., BOWEN, M. D., HARDY, J. L., ELDRIDGE, B. F., CHILES, R. E., JACKSON, A. O., REEVES, W. C. Geographic distribution and serologic and genomic characterization of Morro Bay virus, a newly recognized bunyavirus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **54**: p. 563 – 569, 1996.
- FULTON, F., DUMBELL, K.R. The serological comparison of strains of influenza virus. **Journal of General Microbiology**, **3**: p. 97 – 111, 1946.
- GABALDON, A., ULLOA, G., PULIDO, J. Distribución geográfica, ecología y etología de *Aedeomyia squamipennis*, importante vector natural de malaria aviarian em Venezuela. Boletín de La Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, vol. XXI, nº 2: p, 103 – 113. 1981.

- GALINDO, P., ADAMES, A. J., PERALTA, P. H., JOHNSON, C. M., READ, R.
Impact of the Bayano hydroelectric project on the transmission of
arboviruses. **Revista Medica Panama**, **8**: p. 89 – 134, 1983.
- GOLDMAN, N., ANDERSON, J.P., RODRIGO, A.G., Likelihood-Based test of
Topologies in Phylogenetics. **Systematic Biology**, **49(4)**: p. 652 – 670,
2000.
- GONZALEZ-SCARANO, F., JANSSEN, R. S., NAJJAR, J. A., POBJECKY, N.
NATHANSON, N. An avirulent G1 glycoprotein variant of La Crosse
bunyavirus with defective fusion function. **Journal of Virology**, **54**: p. 757
– 763, 1985.
- GONZALEZ-SCARANO, NATHANSON, N. *Bunyaviridae*. In: **Virology**. Fields,
B. N., Knipe, D. M., Howley (eds). 3^a ed. New York, Raven Press, 1996. p.
1473 – 1504.
- GRADY, L. J., SANDERS, M. L., CAMPBELL, W. P. The sequence of the M
RNA of an isolate of La Crosse virus. **The Journal of General Virology**,
68 (Pt 12): p. 3057 – 3071, 1987.
- GRATZ N. Vector and rodent-borne diseases in Europe and North America:
distribution, public health burden and control. **New York: Cambridge
University Press**; 2006.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to
estimate large phylogenies by maximum likelihood. **System Biology**, **52
(5)**: p. 696 – 704, 2003.
- HALL, T. A. **BioEdit**. Departamento de Microbiologia, Estado da Carolina do
Norte. Universidade Raleigh, NC. 2001.

- HORSFAAL, W. R. Mosquitoes: their bionomics and relation to disease. **New York: The Ronald Press Co**, 284, 1955.
- HUELSENBECK, J.P. & RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics applications note**, vol. 17, n.º 8: p. 754 – 755, 2001.
- INABA, Y., KUROGI, H., OMORI, T. Akabane disease: epizootic abortion, premature birth, stillbirth and congenital arthrogryposis hydranencephaly in cattle, sheep and goats caused by Akabane virus. **Australian Veterinary Journal**, 51: p. 584 – 585, 1975.
- JIN, H., ELLIOTT, R. M. Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. **Journal of Virology**, 67: p. 1396 – 1404, 1993.
- KARABASTOS, N. E. D. **International catalogue of arbovirus including certain other viruses of vertebrates**. 3rd ed. San Antonio, 1985.
- KOHL, A., CLAYTON, R. F., WEBER, F., BRIDGEN, A., RANDALL, R. E., ELLIOTT, R. M. Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. **Journal of Virology**, 77: p. 7999 – 8008, 2003.
- KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetic Analysis. Version 1.01**. The Pennsylvania State University, 2000.
- KUNO, G., CHANG, G. J. J. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. **Clinical of Microbiology. Rev.** 18: p. 608 – 637, 2005.

- LANGEVIN, S. A., BUNNING, M., BRENT, D., KOMAR, N. Experimental infection of chicken as candidate sentinels for West Nile virus. **Emerging Infectious Diseases**, **7**: p. 726 – 729, 2001.
- LEES, J. F., PRINGLE, C. R., ELLIOTT, R. M. Nucleotide sequence of the Bunyamwera virus M RNA segment: conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product. **Virology**, **148**: p. 1 – 14, 1986.
- LENETTE, D. A. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Lennette, E. H., Lennette, D. A., Lennette, E. T. (eds.). Seventh edition, Washington, American Public Health Association, 1995. p. 3 – 25.
- LU, Z., LU, X. J., FU, S. H., ZHANG, S., LI, Z. X., YAO, X. H., FENG, Y. P., LAMBERT, A. J., NI, D. X., WANG, F. T., TONG, S. X., NASCI, R. S., FENG, Y., DONG, Q., ZHAI, Y. G., GAO, X. Y., WANG, H. Y., TANG, Q., LIANG, G. D. Tahyna Virus and Human Infection, China. **Emerging Infectious Diseases**, **Vol. 15, No. 2**: p. 306 – 309, 2009.
- MARTINS, L. C., DINIZ, J. A. P., SILVA, E. V. P., BARROS, V. L. R. S., MONTEIRO, H. A. O., AZEVEDO, R. S. S., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. Characterization of Minaçu virus (Reoviridae: Orbivirus) and pathologic changes in newborn mice experimentally infected. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 63 – 73, 2007.
- MAU, B., NEWTON, M., LARGET, B.. Bayesian phylogenetic inference via markov chain montecarlo methods. **Biometrics**, **55**: 1 – 12, 1999.

- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnico.** 3ª edição. São Paulo, EPU, 1998. p. 295.
- MITCHEL, C. J., MONATH, T. P., SABATTINI, M. S., CROPP, C. B., DAFFNER, J. F., CALISHER, C. H., JAKOB, W. L., CHRISTENSEN, H. A. Arbovirus Investigations in Argentina, 1977 – 1980. II. Arthropod Collections and Virus Isolations from Argentine Mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 34(5): p. 945 – 955, 1985.**
- MITCHEL, C. J., MONATH, T. P., SABATTINI, M. S., DAFFNER, J. F., CROPP, C. B., CALISHER, C. H., DARSIE J. R., JAKOB, W. L. Arbovirus Isolations from Mosquitoes Collected During and After the 1982 – 1983 Epizootic of Western Equine Encephalitis in Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 36(1): p. 107 – 113, 1987.**
- MOHAMED M, MCLEES A, ELLIOTT R. M. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete serogroups in the Orthobunyavirus genus (family Bunyaviridae) do not encode a NSs protein. **Journal of Virology, 83(15): p. 7612 – 7618, 2009.**
- MONATH, T. P., SABATTINI, M. S., PAULI, R., DAFFNER, J. F., MITCHELL, C. J., BOWEN, G. S., CROPP, C. B. Arbovirus Investigations in Argentina, 1977 – 1980. IV. Serologic Surveys and Sentinel Equine Program. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 34(5): p. 966 – 975, 1985.**

- NI, H., BARRETT, A. D. T. Nucleotide and aminoacid differences of structural protein genes of Japanese encephalitis virus from different geographical locations. **Journal of General Virology**, **76**: p. 401 – 407, 1995.
- NICHOL, S. T. Bunyaviruses. *In: Virology*. D.M. Knipe, P.M. Howley, (eds), Vol.2., Lippincott, Williams & Wilkins. 2001. p.1603 – 1668.
- NICHOL, S. T., BEATY, B. J., ELLIOTT, R. M., GOLDBACH, R., PLYUSNIN, A., SCHMALJONH, C. S., TESH, R. B. Family *Bunyaviridae*. *In: Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, I. A. (ed). Elsevier Academic Press, San Diego, California, 2005. p. 695 – 716.
- NUNES, M. R., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., WEAVER, S. C., TESH, R. B., VASCONCELOS, P. F. Molecular epidemiology of group C viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in the Americas. **Journal of Virology**, **79**: p. 10561 – 10570, 2005.
- NUNENS, M. R. T., VASCONCELOS, H. B., MEDEIROS, D. B. A., RODRIGUES, S. G., AZEVEDO, R. S. S., CHIANG, J. O., MARTINS, L. C., VASCONCELOS, P. F. C. A febre do Oropouche: uma revisão dos aspectos epidemiológicos e moleculares na Amazônia Brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. **15**, p. 303 – 318, 2007.
- OHASHI, C. B., BRASIL, R. A. **Estudo da infecção experimental de camundongos albinos suíços recém nascidos com o Vírus Serra Norte (H505240) em microscopia óptica**. Trabalho de conclusão de curso – Belém, Universidade Federal do Pará, 1997. 50p.

- OSBORNE, J. C., ELLIOTT, R. M. RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. **Journal of Virology**, **74**: p. 9946 – 9952, 2000.
- PARDIGON, N., VIALAT, P., GERBAUD, S., GIRARD, M., BOULOY, M. Nucleotide sequence of the M segment of Germiston virus: comparison of the M gene product of several bunyaviruses. **Virus Research**, **11**: p. 73 – 85, 1988.
- PEKOSZ, A., GRIOT, C., NATHANSON, N., GONZALEZ-SCARANO, F. Tropism of bunyaviruses: evidence for a G1 glycoprotein-mediated entry pathway common to the California serogroup. **Virology**, **214**: p. 339 – 348, 1995.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., TRAVASSOS DA ROSA, J. F., ISHAK, R., FREITAS, R. B., GOMES, M. L., LEDUC, J. W. & OLIVA, O. F. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **30**: p. 149 – 160, 1981.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. R. Veronesi, R. Focaccia (eds.) São Paulo, Editora Ateneu, 1996. p. 169 – 180.
- POBJECKY, N., SMITH, J., GONZALEZ-SCARANO, F. Biological studies of the fusion function of California serogroup Bunyaviruses. **Microbial Pathogenesis**, **1**: p. 491 – 501, 1986.

- POLLITT, E., ZHAO, J., MUSCAT, P., ELLIOTT, R. M. Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture. **Virology**, **348**: p. 224 – 232, 2006.
- POSADA, D., CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, **14 (9)**: 817 – 818, 1998.
- PRINGLE, C. R. The *Bunyaviridae* and their genetic - An Overview. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **169**: p. 3 – 25, 1991.
- PROPHET, E. B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B., SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington, American Registry of Pathology, 1992, p. 3 – 80.
- REED, L.S., MUENCH, H. Simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, **27**: p. 493 – 497, 1938.
- ROBERTS, A., ROSSIER, C., KOLAKOFSKY, D., NATHANSON, N., GONZALEZ-SCARANO, F. Completion of the La Crosse virus genome sequence and genetic comparisons of the L proteins of the Bunyaviridae. **Virology**, **206**: p. 742 – 745, 1995.
- ROZHON, E. J., GENSEMER, P., SHOPE, R. E., BISHOP, D. H. L. Attenuation of virulence of a bunyavirus involving an L RNA defect and isolation of LAC/SSH/LAC and LAC/SSH/SSH reassortants. **Virology**, **111**: p. 125 – 138, 1981.
- SAEED, M. F., LI, L., WANG, H., WEAVER, S. C., BARRETT, A. D. Phylogeny of the Simbu serogroup of the genus Bunyavirus. **The Journal of General Virology**, **82**: p. 2173 – 2181, 2001.

- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, **4**: p. 406 – 425, 1987.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **74**: p. 5463 – 5467, 1977.
- SANTOS, N. S. O., Diagnóstico laboratorial das viroses. In: **Introdução à Virologia Humana**. Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D. (eds). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002. p. 25 – 46.
- SCHMALJOHN, C. S. Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. In: **Virology**, Fields BN, Knipe, D.M. (eds). Lippincott – Raven, New York, 1996. p. 1447 – 1471.
- SCHMALJOHN, C. S., PATTERSON, J. L. Bunyaviridae and their replication. In: **Virology**, Fields BN, Knipe, D.M. (eds). Lippincott – Raven, New York, 2001. p. 1175 – 1194.
- SCHMALJOHN, C. S., NICHOL, S. T. Bunyaviridae. In: **Virology**, Fields BN, Knipe, D. M. (eds). Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1741 – 1789.
- SENNE, D. A., PEDERSEN, J. C., HUTTO, D. L., TAYLOR, W. D., SCHMITT, B. J., PANIGRAPHY, B. Pathogenicity of West Nile virus in chickens. **Avian Diseases**, **44**: p. 642 – 649, 2000.
- SMITH, M. G., RUSSELL, J. B., HEYS, F. M. St. Louis encephalitis infection of chicken mites, *Dermanyssus gallinae*, by feeding on chickens with viremia; transovarian passage of virus into the second generation. **Journal of Experimental Medicine**, **86**: p. 229 – 237, 1947.

- SEXTON, D. J., ROLLIN, P. E., BREITSCHWERDT, E. B., COREY, G. R., MYERS, S. A., DUMAIS, M. R., BOWEN, M. D., GOLDSMITH, C. S., ZAKI, S. R., NICHOL, S. T., PETERS, C. J., KZIAZEK, T. G. Life-threatening Cache Valley virus infection. **The New England Journal of Medicine**, **336**: p. 547 – 549, 1997.
- SIIRIN, M. T., DUAN, T., LEI, H., GUZMAN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., WATTS, D. M., XIAO, S. Y., TESH, R. B. Chronic St. Louis Encephalitis Virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **76 (2)**: p. 299 – 306, 2007.
- SHI, X., KOHL, A., LEONARD, V. H., LI, P., MCLEES, A., ELLIOTT, R. M. Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. **Journal of Virology**, **80**: p. 8089 – 8099, 2006.
- SHOPE, R.E.; CAUSEY, O.R. Further studies on the serological relationships of group C arthropod-borne viruses and the association of these relationships to rapid identification of types. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **11**: 283-290, 1962.
- SHOPE, R. E. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia**, **11**: p. 167-171, 1963.
- SHOPE, R. E., WOODALL, J. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. The epidemiology of disease caused by viruses in group C and Guamá

- (*Bunyaviridae*). In: **The Arboviruses: epidemiology and ecology**. Monath, T. P. (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1988. p. 37 – 52.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods, version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M., WOOLHOUSE, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society, 356**: p. 983 – 989, 2001.
- TESH, R. B., SIIRIN, M., GUZMAN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., WU, X., DUAN, T., LEI, H., NUNES, M. R., XIAO, S. Y. Persistent West Nile Virus infection in the Gold Hamster: Studies on its mechanism and possible implications for other Flavivirus infection. **The Journal of Infection Diseases, 192**: p. 287 – 295, 2005.
- TONRY, J. H., XIAO, S. Y., SIIRIN, M., CHEN, H., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TESH, R. B. Persistent shedding of West Nile Virus in Urine of experimentally infected Hamsters. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 72 (3)**: p. 320 – 324, 2005.
- THOMPSON, W. H., BEATY, B. J. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. **Science, 196**: p. 530 – 531, 1977.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. J., The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acidic Research, 25**: 4876 – 4882, 1997.

- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., VASCONCELOS, P. F. C., PINHEIRO, F. P. Arboviroses. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. LEÃO, R.N.Q. (ed). Belém Cejup – UEPA - Instituto Evandro Chagas, 1997, p. 207 – 226.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., PINHEIRO, F. P. Clinical and epidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 2: p. 117 – 124, 1992.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., SHOPE, R. E., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., RODRIGUES, S. G., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., Arbovirus pathogenic for man in Brazil. In: **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C. Travassos da Rosa, J. F. S. (ed.), 1998. p. 74.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., RODRIGUES, S. G., ROSA, E.S.T., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17: p. 155 – 164, 2001
- VASCONCELOS, H. B. **Epidemiologia molecular do Vírus Oropouche (*Bunyaviridae, Orthobunyavirus*) na Amazônia Brasileira**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2009. 140p.

- VINH DC, EMBIL JM. Hantavirus Pulmonary Syndrome: A Concise Clinical Review. **Southern Medical Journal**. 2009 (no prelo).
- WANG, M., PENNOCK, D. G., SPIK, K. W., SCHMALJOHN, C.S. Epitope mapping studies with neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies to the G1 and G2 envelope glycoproteins of Hantaan virus. **Virology** 197: p. 757 – 766, 1993.
- WANG, H., BEASLEY, D. W., LI, L., HOLBROOK, M. R., BARRETT, A. D. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the medium RNA segment of Oropouche, a Simbu serogroup virus: comparison with the middle RNA of Bunyamwera and California serogroup viruses. **Virus Research** 73: p. 153 – 162, 2001.
- WANZELLER, A. L. M, DINIZ, J. A. P., GOMES, M. L. C, CRUZ, A. C. R, SOARES, M. C. P, DE SOUZA W., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A, VASCONCELOS, P. F. C.. Ultrastructural Antigenic and Physicochemical Characterization of the Mojuí dos Campos (Bunyavirus) Isolated from Bat in the Brazilian Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(3)**: p. 307 – 311, 2002.
- WEBER, F., BRIDGEN, A., FAZAKERLEY, J. K., STREITENFELD, H., KESSLER, N., RANDALL, R. E., ELLIOTT, R. M. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. **Journal of Virology**, 76: p. 7949 – 7955, 2002.
- WHITMAN, L., SHOPE, R. E. The California complex of arthropod-borne viruses and its relationship to the Bunyamwera group through Guaroa

virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **11**: p. 691 – 696, 1962.

YADAV, P. D., MISHRA, A. C., MOURYA, D. T. Molecular characterization of *Umbre Virus* (Bunyaviridae). **Journal Virology**, **5**: p. 115 – 118, 2008.

YANASE, T., YOSHIDA, K., OHASHI, S., KATO, T., TSUDA, T. Sequence analysis of the medium RNA segment of three Simbu serogroup viruses, Akabane, Aino, and Peaton viruses. **Virus Research**, **93**: p. 63 – 69, 2003.