

MÁRCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, CORRELAÇÃO ANTIGÊNICA E
ECOEPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DO GRUPO C (*BUNYAVIRIDAE*,
ORTHOBUNYAVIRUS) ISOLADOS NAS AMÉRICAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro
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: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Co-orientadora: Dra. Amélia P.A.Travassos da Rosa

BELÉM

2005

MÁRCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, CORRELAÇÃO ANTIGÊNICA E
ECOEPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DO GRUPO C (*BUNYAVIRIDAE*,
ORTHOBUNYAVIRUS) ISOLADOS NAS AMÉRICAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro
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: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Co-orientadora: Dra. Amélia P.A.Travassos da Rosa

BELÉM

2005

MÁRCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, CORRELAÇÃO ANTIGÊNICA E
ECOEPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DO GRUPO C (*BUNYAVIRIDAE*,
ORTHOBUNYAVIRUS) ISOLADOS NAS AMÉRICAS.**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos,
Instituto Evandro Chagas

Co-Orientadora: Dra. Amélia P.A. Travassos da Rosa, UTMB

Banca Examinadora:

Membro Titular Dr. Antônio Carlos Vallinoto, UFPA

Dr. Francisco P. Pinheiro, Instituto Evandro Chagas

Dra. Gilberta Bensabath, Instituto Evandro Chagas

Dr. Ricardo Ishak, UFPA

Membro suplente

Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, UFPA

Dra. Rita Catarina Medeiros, UFPA

Belém, 28 de Fevereiro de 2005

EPIGRAFE

*“Entre os homens, em todos os campos da vida,
o que deve prevalecer é o respeito, a
honestidade e a sinceridade em seus atos.”*

(Márcio Roberto Teixeira Nunes)

DEDICATÓRIA

A Deus, por todas as oportunidades que a vida me tem oferecido.

Aos meus queridos pais João Antônio Bittencourt Nunes e Alcione Teixeira Nunes, à minha querida esposa Keley Nunes e aos nossos filhos, aos meus irmãos Paulo Maurício e João Marcelo, aos meus avós Raimundo Nelson Teixeira e Antonia Pereira Teixeira (*In Memoriam*); Joaquim Pinto Nunes e Carmem Bittencourt Nunes (*In Memoriam*), pelo apoio, amor e principalmente pela constante contribuição para o meu aperfeiçoamento moral.

Aos estimados Dr. Robert Shope (*In Memoriam*), Dr. Robert Tesh e Dra. Amelia Travassos da Rosa, pelos exemplos de dignidade, fidelidade e amizade dados a mim.

Ao Dr. Pedro Vasconcelos, pelo apoio, amizade e pela orientação desta Tese de Doutorado.

AGRADECIMENTOS

Os dados reportados nesta tese de Doutorado refletiram o esforço conjunto de um grupo de pesquisadores brasileiros e americanos mediante o estabelecimento de um trabalho colaborativo, inicialmente entre a Fundação SESP (Serviço Especial em Saúde Pública) e Fundação Rockefeller, e posteriormente entre o Instituto Evandro Chagas, Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Belém, Pará, e a Universidade do Texas, Galveston, Departamento de Patologia. Muitos pesquisadores e excelentes técnicos laboratoristas participaram nas diferentes etapas deste estudo, iniciado com os trabalhos clássicos de campo, caracterização antigênica e estudos ecoepidemiológicos realizados entre as décadas de 50 e 80, sendo finalizado em 2005 com a obtenção e análise dos dados genéticos. Meus mais sinceros agradecimentos são destinados a todas as gerações de pesquisadores e técnicos que contribuíram para o sucesso deste trabalho ao longo de 51 anos, entre 1954 e 2005, que certamente serão sempre lembrados pela sua seriedade, honestidade e, sobretudo integridade. Este estudo foi em parte financiado pelas seguintes instituições: CAPES/ Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários; CNPq *grants* nº 302770/02-0 e 550275/01-0; NHI *grant* nº N01-AI30027.

Marcio Roberto Teixeira Nunes

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| RESUMO..... | xvii |
| ABSTRACT..... | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 1.1 GRUPO C DOS ARBOVÍRUS: BREVE HISTÓRICO..... | 01 |
| 1.2 OS VÍRUS DO GRUPO C..... | 04 |
| 1.2.1 Classificação sorológica..... | 04 |
| 1.2.2 Relacionamento antigênico..... | 06 |
| 1.2.3 Distribuição geográfica..... | 09 |
| 1.2.4 Hospedeiros vertebrados e invertebrados | 09 |
| 1.2.5 Ciclos de transmissão..... | 13 |
| 1.2.6 Infecção experimental em animais e estudos de patologia..... | 15 |
| 1.2.7 Infecção em humanos: aspectos clínicos e patológicos..... | 16 |
| 1.2.8 Diagnóstico e tratamento de infecções humanas..... | 17 |
| 1.2.9 Microscopia eletrônica, propriedades físico-químicas e biológicas..... | 18 |
| 1.2.10 Ácido nucléico..... | 22 |
| 1.2.11 Organização genômica..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 1.3 REARRANJO GENÉTICO: MECANISMO DE EVOLUÇÃO ENTRE OS ORTOBUNYAVÍRUS..... | 26 |
| 1.4 OBJETIVOS..... | 28 |
| 1.4.1 Objetivos geral | 28 |
| 1.4.2 Objetivos específicos | 28 |
| 2 MATERIAS E MÉTODOS | 29 |
| 2.1 AMOSTRAS..... | 29 |
| 2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DO GRUPO C..... | 29 |
| 2.2.1 Propagação viral em cultura de célulasVERO - E6 (células renais de macaco verde africano, <i>Cercopithecus aethiops</i>) | 31 |
| 2.2.2 Precipitação e purificação viral | 31 |
| 2.2.3 Extração do ARN viral | 32 |
| 2.2.4 RT-PCR | 34 |
| 2.2.5 Análise do produto da RT-PCR | 36 |
| 2.2.6 Purificação do cADN | 37 |
| 2.2.7 Clonagem do cADN | 38 |
| 2.2.7.1 Vetor de clonagem..... | 38 |
| 2.2.7.2 Ligaçã..... | 39 |
| 2.2.7.3 Transformaçã..... | 41 |
| 2.2.7.4 Seleçã e multiplicaçã de clones mutantes..... | 42 |
| 2.2.8 Análise do produto da RT-PCR clonado | 43 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.9 Seqüenciamento | 45 |
| 2.3 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS E FILOGENIA..... | 46 |
| 3. RESULTADOS | 48 |
| 3.1 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA RT-PCR PARA OS SEGMENTOS P-ARN E M-ARN..... | 48 |
| 3.2 CLONAGEM..... | 48 |
| 3.3 O SEGMENTO P-ARN DOS VÍRUS DO GRUPO C..... | 51 |
| 3.4 O SEGMENTO M-ARN DOS VÍRUS DO GRUPO C: SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA PARCIAL DO GENE Gn..... | 67 |
| 3.5 RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS VÍRUS DO GRUPO C..... | 71 |
| 3.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA..... | 76 |
| 3.7 RELAÇÃO ENTRE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E A GENÉTICA DOS VÍRUS PERTENCENTES AO GRUPO C..... | 80 |
| 3.8 MODELO HIPOTÉTICO DE REARRANJO GENÉTICO DOS VÍRUS DO GRUPO C..... | 81 |
| 4. DISCUSSÃO | 85 |
| 5. CONCLUSÕES | 92 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS | 94 |
| APÊNDICE | 106 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1 – Localização geográfica da floresta do Oriboca, Estado do Pará: sítio de isolamento dos primeiros arbovírus do Grupo C..... | 03 |
| Figura 2 - Representação esquemática do padrão de relacionamento antigênico dos vírus do grupo C isolados na Amazônia Brasileira . Barras em azul e vermelho indicam os pares antigênicos estabelecidos pelos testes de FC, IH e/ou N. Fonte: Shope & Causey, 1962..... | 08 |
| Figura 3 – Distribuição geográfica dos vírus do Grupo C nas Américas..... | 11 |
| Figura 4 – Ciclos silvestres de transmissão dos vírus do grupo C. I). Ciclo na copa; II) Ciclo no solo; III) Ciclo circunstancial envolvendo o homem como hospedeiro vertebrado. * mosquitos do gênero <i>Culex</i> , subgênero <i>Melanoconium</i> ; ** roedores pertencentes aos gêneros <i>Oryzomys</i> , <i>Proechimys</i> , <i>Nectomys</i> e <i>Zigodontomys</i> ; *** marsupiais pertencentes aos gêneros <i>Marmosa</i> , <i>Didelphis</i> e <i>Caluromys</i> . Fonte: Adaptado de Toda & Shope, 1965..... | 14 |
| Figura 5 – Microscopia eletrônica dos vírus do grupo C: diversos aspectos das partículas virais (setas) em vesículas citoplasmáticas freqüentemente associadas ao complexo de Golgi (G); letras (a) e (b) – VAPEU; (c) – VNEP; (d) – VMUR; (e)- partícula do vírus VMUR em maior aumento evidenciando o envelope lipídico (E); N – núcleo celular; RE – retículo endoplasmático. Fonte: Adaptado de Kitajima <i>et al.</i> (1982)..... | 19 |

Figura 6 – Partícula dos vírus do grupo C. (a) microscopia eletrônica da partícula do VMTB (V) observada no interior de uma vesícula citoplasmática (Ve) de células VERO infectadas; (b) representação esquemática da partícula viral evidenciando os três segmentos de ARN (P-ARN, M-ARN e G-ARN) associados a proteína L. Circundando cada molécula de ARN, observa-se a proteína N, e as duas glicoproteínas Gn e Gc emergindo do envelope (E).

Fonte: Adaptado de Bouloy, 1991..... 20

Figura 7 – Representação esquemática das moléculas de ARN (P-ARN, M-ARN e G-ARN) dos ortobunyavírus. Observar os nucleotídeos altamente conservados e complementares ao nível da região terminal 3'e 5' não codificante.

Fonte: Adaptado de Bouloy, 1991..... 23

Figura 8 – Organização genômica dos ortobunyavírus. Segmentos de ARN polaridade negativa. I: segmento G-ARN dando origem a proteína L, possível polimerase viral; II: segmento M-ARN, inicialmente originando uma poliproteína que por clivagem cotranslacional origina as duas proteínas glicoproteínas de superfície (Gn e Gc) e uma proteína não estrutural, NSs; III: segmento P-ARN com duas cadeias abertas para leitura superpostas que dão origem a uma proteína de nucleocapsídeo N e uma proteína não estrutural NSs.

Fonte: Adaptado de Bouloy, 1991..... 25

Figura 9 - Mapa circular do vetor plasmidial pGEM-T Easy (Invitrogen) utilizado para clonagem dos cADNs obtidos para os vírus do grupo C.

Observar. Fonte: *Promega Thecnical Manual Part#* TM042 40

Figura 10 – Sítios de clivagem do cADN inserido. A clivagem pela enzima de restrição ECO RI é realizada ao nível dos nucleotídeos 52 e 70 da seqüência do ADN plasmidial (setas em vermelho). Fonte: *Promega Thecnical Manual*

Part# TM042..... 44

Figura 11 – Visualização dos produtos de RT-PCR (cADN) para os segmentos P-ARN (a) e M-ARN (b) em gel de agarose a 1,2% para os vírus do grupo C. CN: controle negativo (amostra de fluido de células VERO não infectadas); PM: marcador de peso molecular 100bp-1,5kbp (Promega).....

49

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% evidenciando os produtos de clonagem para os segmentos P-ARN (a) e M-ARN, gene Gn (b). Bandas com 3kb: ADN plasmidial. Orifícios 1, 8, 17: peso molecular 0,1 – 10kb (Promega); 9: ADN plasmidial com inserção não bem sucedida (ADN inserido de tamanho não esperado para o segmento P-ARN); 18 e 26: peso molecular 0,1-1,5 kb (Promega); 2: V VIN; 3 e 19: VITQ; 4 e 20: VMUR; 5: VNEP; 6 e 21: VRES; 7 e 22: VMTB; 10 e 23: VAPEU; 11 e 24: VORI; 12: VOSSA; 13 e 25:VCAR; 14: VBCR; 15: VGL; 16:VMAD.....

50

Figura 13 – Seqüências nucleotídicas do segmento P-ARN dos 13 vírus protótipos pertencentes ao grupo C e da amostra BeH 5546. Letras em caixa alta representam as seqüências aminoacídicas para os genes N e NSs. Os codons de iniciação e terminalização estão representados por metioninas (M) e estrelas, respectivamente.....

52-65

Figura 14 – Seqüências nucleotídicas parciais do gene Gn, segmento M-ARN (345 nt) obtidas para sete protótipos virais do grupo C e para a amostra BeH 5546. Letras em caixa alta correspondem a seqüência de aminoácidos transcritas a partir das seqüências nucleotídicas..... 68-71

Figura 15 – Análise filogenética dos vírus do grupo C (gene N;P-ARN). Os vírus do grupo C foram distribuídos em três grupos filogenéticos (I, II e III). O percentual de *bootstrap* foi calculado para 1000 replicons. Valores dentro e fora dos parênteses correspondem aos percentuais obtidos para os métodos de MP e NJ, respectivamente. Membros dos grupos Simbu, Califórnia e Bunyamwera foram utilizados para análise filogenética comparativa. A escala em barra representa 10% de divergência nucleotídica..... 77

Figura 16 – Análise filogenética das amostras dos VORI, VMUR, VITQ, VCAR, VMTB e VNEP isolados de diferentes hospedeiros e áreas geográficas. H: corresponde a amostras isoladas de humanos. Percentuais de *bootstraps* obtidos para os métodos de MP e NJ, encontram-se dentro e fora dos parênteses, respectivamente. Membros do grupo Simbu foram utilizados como grupos externos para enraizamento da árvore. A escala representa 10% de divergência nucleotídica..... 78

Figura 17 – Filogenia dos segmentos P (a) e M (b). Valores de *bootstraps* obtidos para os método de MP e NJ encontram-se localizados dentro e fora dos parêntesis, respectivamente. Os números exibidos nas barras em a e b representam 5% e 10% de divergência nucleotídica, respectivamente..... 79

Figura 18 – Árvore filogenética construída para o segmento P-ARN (gene N) dos vírus do grupo C isolados de diferentes localidades das Américas. Valores dentro e fora dos parênteses indicam os percentuais de *bootstrap* obtidos para os métodos de MP e NJ, respectivamente. Os vírus do grupo Simbu foram utilizados como grupos externos para enraizamento da árvore. A escala representa 10% de divergência nucleotídica.....

80

Figura 19 – Modelo hipotético de rearranjo viral para os vírus do grupo C. (I) Co-infecção de uma célula hospedeira (vertebrados ou invertebrados); II. Multiplicação do genoma viral; (III) Rearranjo dos segmentos de ARN; e (IV) Possíveis linhagens virais após o rearranjo dos segmentos de ARN genômicos.....

82

Figura 20 – Possíveis padrões de rearranjo genético: (a) Padrão de rearranjo para os vírus do grupo C comparando o relacionamento antigênico pelos testes de FC, IH e N, ao genético baseado nas seqüências obtidas para os segmentos P-ARN e M-ARN. (b) Padrão de rearranjo para a cepa BeH 5546. V1: vírus parental 1; V2: vírus parental 2; rG1M1P2, rG2M2P1 e rG1M2P1: possíveis progênes virais envolvidas no processo de rearranjo dos vírus do grupo C.....

83

Figura 21 – Possíveis padrões de rearranjo genético para outros ortobunyavírus: (a) Vírus Jatobal (*Orthobunyavirus*, grupo Simbu) e (b) Vírus Ngari (*Orthobunyavirus*, grupo Bunyamwera). Setas pontilhadas indicam a origem dos segmentos de ARN dos vírus Jatobal e Ngari mediante rearranjo genético com vírus não identificados (V2?) e seus correspondentes vírus

parentais (V1), *Oropouche* e *Bunyamwera*, respectivamente. rG1M2P1
corresponde a provavel progene viral gerada pelo rearranjo genético dos
segmentos de ARN..... 84

LISTA DE TABELAS

Página

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Distribuição dos vírus pertencentes ao grupo C em complexos, tipos, subtipos, área geográfica, e fonte de isolamentos..... | 05 |
| Tabela 2 – Relacionamento antigênico para os vírus do grupo C isolados na Amazônia Brasileira mediante aplicação dos testes sorológicos de FC e IH.... | 07 |
| Tabela 3 – Hospedeiros invertebrados e vertebrados dos vírus do grupo C..... | 12 |
| Tabela 4 - Amostras dos virus do grupo C usadas no estudo evidenciando os respectivos números das amostras, localidade (país), hospedeiro e ano isolamento..... | 30 |
| Tabela 5 – Reação de ligação..... | 41 |
| Tabela 6 - Segmento P-ARN dos virus do grupo C..... | 66 |
| Tabela 7 – Relação genética dos virus do grupo C baseado na seqüência nucleotídica do gene N, segmento P-ARN..... | 73 |
| Tabela 8 – Relação genética dos virus do grupo C baseado na seqüência nucleotídica do gene N, segmento P-ARN para cepas dos VORI, VMUR, VNEP, VCAR..... | 74 |
| Tabela 9 - Comparação entre as seqüências nucleotídicas e aminoacídicas para as seqüências nucleotídicas do segmento M-ARN, gene Gn dos vírus do grupo C..... | 75 |
| | |

LISTA DE ABREVIATURAS

A – adenina

aa – aminoácidos

amp^r – ampicilina resistente

C – citosina

CO₂ - gás carbônico

CsCl – cloreto de céσιο

cm² – centímetro quadrado

dATP – dinucleotídeo adenosina trifosfato

dCTP – dinucleotídeo citosina trifosfato

dGTP – dinucleotídeo guanidina trifosfato

dTTP – dinucleotídeo timidina trifosfato

ddATP – dideoxinucleotídeo adenosina trifosfato

ddCTP – dideoxinucleotídeo citosina trifosfato

ddGTP – dideoxinucleotídeo guanidina trifosfato

DNTP – dinucleotídeos trifosfato

DTT – dietriol treitol

dTTP –dinucleotídeo timidinatrifosfato

ECP – efeito citopático

EDTA – etilenodiamino ácido tetra acético

G – guanina

g/cm³ – gramas por centímetro cúbico

Kb – kilobases

KCl – cloreto de potássio

kDa – kilodaltons

LB – *liquid broth*

M – molar

mA – miliamper

MEM – *minimum essencial médium*

mg – miligramas

MgCl₂ - cloreto de magnésio

Mg/mL – miligramas por mililitro

mL – mililitro

mM – milimolar

Mm – milímetro

NaCl – cloreto de sódio

NaCH₃COO – Acetato de sódio

NaCO₃ – carbonato de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

ng – nanogramas

nt - nucleotídeos

pb – pares de bases

PBS – *phosphate buffered saline*

PEG – polietilenoglicol

pH – potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

r.p.m – rotações por minuto

SBF – soro bovino fetal

T – timina

TE – tris EDTA

Tris-HCl – tris ácido clorídrico

U – uracila

u – unidades

U.F.P – unidade formadora de placas

V – volts

μg – micrograma

$\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro

μL – microlitro

μm – micrômetro

μM – micromolar

$^{\circ}\text{C}$ – graus celsius

RESUMO

Até o presente momento, estudos moleculares para os vírus do grupo C (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) não foram publicados. O presente trabalho determinou as seqüências nucleotídicas completas para os segmento ARN pequenos (P-ARN) e a seqüências parciais para os segmentos de ARN médio (M-ARN) dos vírus do grupo C. A seqüência completa do segmento P-ARN variou de 915 a 926 nucleotídeos, e revelou organização genômica semelhante em comparação aos demais ortobunyavírus. Baseado nos 705 nt do gene N, os membros do grupo C foram distribuídos em três grupos filogenéticos principais, com exceção do vírus *Madrid* que foi posicionado fora destes três grupos. A análise da cepa BeH 5546 do vírus *Caraparu* revelou que o mesmo apresenta seu segmento P-ARN semelhante ao do vírus *Oriboca*, sendo um vírus rearranjado em natureza. Em adição, a análise dos 345 nt do gene Gn para sete vírus do grupo C e para a cepa BeH 5546, revelou uma diferente topologia filogenética, sugerindo um padrão de rearranjo genético entre estes vírus. Estes achados representam as primeiras evidências de rearranjo genético em natureza entre os vírus do grupo C, dos quais vários são patógenos humanos. Finalmente, nossos dados genéticos corroboraram dados de relacionamento antigênico entre esses vírus determinados utilizando métodos sorológicos (testes de fixação de complemento, inibição da hemaglutinação e neutralização), sugerindo que a associação de dados informativos aos níveis molecular, sorológico e eco-epidemiológico podem contribuir para o melhor entendimento da epidemiologia molecular dos ortobunyavírus.

ABSTRACT

To date, no molecular studies on group C viruses (*Bunyaviridae*: *Orthobunyavirus*) have been published. The current work determined the complete small RNA segment and partial medium RNA segment nucleotide sequences for group C members. The full-length SRNA sequences ranged from 915 to 926 nucleotides in length, and revealed similar organization in comparison with other orthobunyaviruses. Based on the 705 nt of the N gene, group C members were distributed into 3 major phylogenetic groups, with the exception of *Madrid virus* that was placed outside of these 3 groups. Analysis of the *Caraparu virus* strain BeH 5546 revealed that it has an SRNA sequence nearly identical to that of *Oriboca virus* and is a natural reassortant virus. In addition, analysis of 345 nucleotides of the Gn gene for seven group C viruses and for strain BeH 5546 revealed a different phylogenetic topology, suggesting a reassortment pattern among them. These findings represent the first evidence for natural reassortment among the group C viruses, which include several human pathogens. Furthermore, our genetic data corroborate previous antigenic relationships determined using serologic assays (complement fixation, hemagglutination inhibition and neutralization tests), and suggest that a combination of informative molecular, serological and ecological data is a helpful tool to understand the molecular epidemiology of orthobunyavirus.

1. INTRODUÇÃO

1.1 GRUPO C DOS ARBOVÍRUS: BREVE HISTÓRICO

Os vírus do grupo C, juntamente com os vírus do grupo Guamá, estão entre os primeiros agentes isolados na década de 1950 quando pesquisadores do Serviço Especial de Saúde Pública do Brasil e da Fundação Rockefeller iniciaram uma busca intensa com o objetivo de encontrar respostas para a real causa dos casos humanos febris semelhantes à febre amarela, ocorridos às proximidades da cidade de Belém, Estado do Pará, região Norte do Brasil (Causey *et al.*, 1961). Os pesquisadores responsáveis pelo estudo concluíram que os casos de febre estavam ocorrendo principalmente entre trabalhadores trazidos da região Nordeste para realizar atividades de desflorestamento, plantação de pimenta do reino e extração de borracha, bem como entre imigrantes japoneses estabelecidos em pequenas comunidades às margens da floresta. Observou-se também que moradores da área urbana da cidade de Belém ficavam doentes ao entrarem na floresta. Inicialmente, cinco diferentes vírus do grupo C foram isolados a partir do soro de macacos sentinelas (*Cebus apella*) não imunes, expostos na floresta do Oriboca localizada 20km oeste de Belém (Figura 1) após inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos (1-3 dias).

As amostras isoladas foram enviadas para o laboratório de Virologia da Fundação Rockefeller, Nova York, para comparação com outros arbovírus provenientes de diferentes regiões do mundo. Casals e Whitman evidenciaram que os novos agentes eram completamente distintos dos dois sorogrupos até então descritos: A (Alphavirus) e B (Flavivirus) dos arbovírus. Deste modo, os cinco vírus foram classificados como membros de um novo

grupo sorológico designado de grupo C (Casals & Whitman, 1961).

Em 1957, camundongos passaram a ser utilizados como animais sentinelas juntamente com macacos. Os primeiros, mostraram-se modelos eficientes para o isolamento e monitoramento de arbovírus. Estas observações encorajaram o uso desses animais e também de hamsters como animais sentinelas em países das Américas Central (Trinidad e Panamá), do Sul (Peru e Colômbia), e do Norte (México e Estados Unidos) resultando no isolamento de outros vírus do grupo C em cada um desses locais (Karabatsos, 1985).

Atualmente, treze vírus diferentes já foram descritos como membros do grupo C estando todos associados a áreas de floresta (usualmente floresta pantanosa) em regiões tropicais e subtropicais das Américas e transmitidos a pequenos roedores, primatas não humanos, marsupiais e seres humanos por mosquitos culicíneos (Metselaar, 1966; Woodall, 1967; Calisher *et al.*, 1983; Karabatsos, 1985; 2002)

O impacto primário ao nível de saúde pública, causado por esses vírus converge a um grupo de pessoas cuja ocupação principal está relacionada com trabalho que exige exposição às áreas de floresta, tais como membros de expedições geológicas, militares em atividade, e trabalhadores extrativistas como catadores de castanha, seringueiros (extração de borracha), garimpeiros, lenhadores, agricultores e lavradores. Estes vírus não causam epidemias ou doença fatal, no entanto são comumente responsáveis por doença febril autolimitante, que muitas vezes, leva a pessoa acometida a significativa perda de produtividade em seu trabalho (Pinheiro & Travassos da Rosa, 1994; Pinheiro *et al.*, 1996).

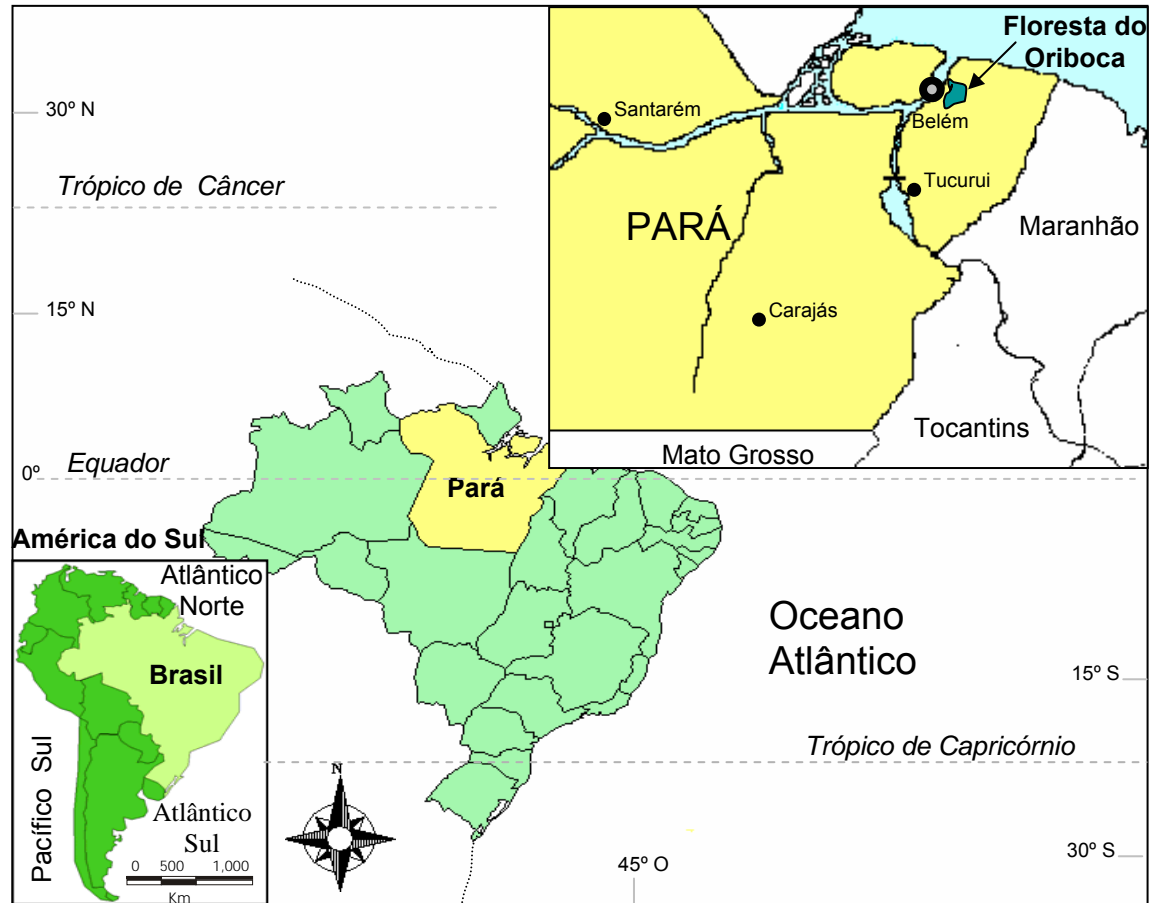


Figura 1 – Localização geográfica da floresta do Oriboca, Estado do Pará: sítio de isolamento dos primeiros arbovírus do Grupo C.

1.2 OS VÍRUS DO GRUPO C

1.2.1 Classificação sorológica.

Os vírus do grupo C são vírus pertencentes à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* (Büchen-Osmond, 2003). Sorologicamente estão incluídos no Supergrupo Bunyamwera sendo classificados segundo suas propriedades antigênicas estabelecidas por testes sorológicos como fixação de complemento (FC), inibição da hemaglutinação (IH) e neutralização (N) (Casals & Whitman, 1961; Causey *et al.*, 1961; Shope & Whitman, 1966; Spence *et al.*, 1966; Spence *et al.*, 1968) .

Este grupo compreende um total de treze vírus, dentre espécies e subespécies virais atualmente registrados no suplemento 108 do *International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates* (Karabatsos, 2002), sendo os mesmos distribuídos em quatro complexos denominados Caraparu, Marituba, Oriboca e Madrid segundo resultados obtidos mediante aplicação de testes de FC, IH e N.

O complexo Caraparu inclui os vírus *Caraparu* (VCAR), Apeu (VAPEU), Bruconha (VBCR), Ossa (VOSSA) e Vinces (VVIN). O complexo Marituba abrange os vírus *Marituba* (VMTB), Murutucu (VMUR), Restan (VRES), Nepuyo (VNEP) e Gumbo Limbo (VGL). O complexo Oriboca é formado apenas pelos vírus *Oriboca* (VORI) e Itaqui (VITQ). Finalmente, o complexo Madrid engloba apenas o vírus *Madrid* (VMAD), sendo este considerado o membro do grupo C antigenicamente mais distinto (Tabela 1) (Causey *et al.*, 1961; Metsellar, 1966; Jonkers *et al.*, 1968a; Jonkers *et al.*, 1968b; Iversson *et al.*, 1987; Shope *et al.*, 1988; Calisher, 1998)

Tabela 1 - Distribuição dos vírus pertencentes ao grupo C em complexos, tipos, subtipos, área geográfica, e fonte de isolamentos.

| Grupo | Complexo | Espécie | Subespécie | Distribuição Geográfica | Fonte de Isolamentos |
|----------------|--------------------|-----------------|--|---|---|
| C | Caraparu | <i>Caraparu</i> | | Brasil, Trinidad, Panamá, Guiana Francesa e Suriname | mosquitos, humanos, roedores |
| | | | Ossa | Panamá | mosquitos, humanos, roedores |
| | | | Apeu | Brasil | mosquitos, humanos e marsupiais |
| | | | Vinces | Equador | mosquitos e hamsters |
| | | | Bruconha | Brasil | sentinelas Mosquitos |
| | Madrid | <i>Madrid</i> | | Panamá | mosquitos, humanos, roedores |
| | Marituba | <i>Marituba</i> | | Brasil e Peru | mosquitos, humanos e marsupiais |
| | | | Murutucu | Brasil e Guiana Francesa | mosquitos, humanos, roedores e marsupiais |
| | | | Restan Nepuyo | Trinidad, Suriname Trinidad, Brasil, Honduras, México, Panamá, Guatemala | mosquitos e humanos mosquitos, humanos, roedores, marsupiais e morcegos. |
| | Gumbo Limbo | | Florida (USA) | mosquitos e roedores | |
| Oriboca | <i>Oriboca</i> | | Brasil, Trinidad, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Panamá | mosquitos, humanos, roedores e marsupiais | |
| | | Itaqui | Brasil e Venezuela | mosquitos, humanos, roedores e marsupiais. | |

Fonte: Karabatsos, 2002

1.2.2 Relacionamento antigênico

O complexo padrão de relacionamento antigênico estabelecido entre os membros do grupo C, só pôde ser compreendido após estudos criteriosos desenvolvidos por Shope & Causey (1962) tendo como base as propriedades antigênicas desses agentes.

Os seis protótipos brasileiros (VAPEU, VMTB, VCAR, VMUR, VITQ e VORI) mostram padrões antigênicos distintos quando analisados pelos testes de FC e IH e/ou N. Pelo teste de FC, os VAPEU-VMTB, VORI-VMUR e VCAR-VITQ mostraram forte associação antigênica constituindo pares bem definidos. Em contraste, pelo teste de N e/ou IH, estes mesmos vírus assumiram pares antigênicos distintos dos observados por FC. Neste caso, os pares antigênicos foram estabelecidos como segue: VCAR-VAPEU, VORI-VITQ, e VMTB-VMUR (Shope & Causey, 1962) (Tabela 2).

Este padrão de relacionamento antigênico tornou-se reproduzível para centenas de isolamentos dos vírus do grupo C, excetuando-se para a cepa BeH 5546 isolada em 1955 do soro de um indivíduo que esteve em contato com o nicho ecológico desses vírus ao adentrar a floresta do Oriboca. Ressalte-se que três outros isolamentos da cepa BeH 5546 foram feitos posteriormente de camundongos sentinelas. Estes isolamentos apresentaram um padrão antigênico completamente diferenciado das demais, reagindo pelo teste de FC com os vírus VORI e VMUR, enquanto que pelo teste de IH, reagiam com o vírus VCAR, sendo por isso consideradas amostras virais aberrantes. Estes dados possibilitaram a diagramação da relação antigênica dos vírus do grupo C o que, atualmente, nos permite a rápida e precisa

identificação desses vírus (Figura 2).

Tabela 2 – Relacionamento antigênico para os vírus do grupo C isolados na Amazônia Brasileira, mediante aplicação dos testes sorológicos de FC e IH.

| Antígeno ^(a) | FC | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------------------|
| | Fluido ascítico imune (FAI) | | | | | | |
| | VORI | VMUR | VMTB | VAPEU | VCAR | VITQ | BeH 5546 ^(b) |
| VORI | 32 | 32 | 4 | 4 | 0 | 0 | 32 |
| VMUR | 16 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 |
| VMTB | 8 | 4 | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 |
| VAPEU | 0 | 16 | 8 | 16 | 0 | 0 | 0 |
| VCAR | 0 | 0 | 0 | 0 | 64+ | 64+ | 0 |
| VITQ | 4 | 0 | 0 | 0 | 64+ | 64+ | 0 |
| BeH 5546* | 16 | 16 | 4 | 4 | 0 | 0 | 16 |

| FAI | HI | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Antígeno ^(a) | | | | | | |
| | VORI | VITQ | VMUR | VMTB | VCAR | VAPEU | BeH 5546* |
| VORI | 320 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VITQ | 0 | 320+ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VMUR | 0 | 10 | 160 | 40 | 20 | 20 | 0 |
| VMTB | 0 | 0 | 40 | 640+ | 20 | 0 | 0 |
| VCAR | 0 | 10 | 10 | 40 | 5120 | 640 | 2560 |
| VAPEU | 0 | 0 | 0 | 0 | 640 | 2560 | 320 |
| BeH 5546 ^(b) | 0 | 0 | 0 | 0 | 160 | 20 | 640 |

Fonte: Adaptado de Causey & Shope, 1962.

a: antígeno de soro-vírus; b: soro convalescente; * amostra viral com padrão antigênico diferenciado reagindo com o VORI e VMUR pelo teste de FC e com o VCAR pelo teste de IH.

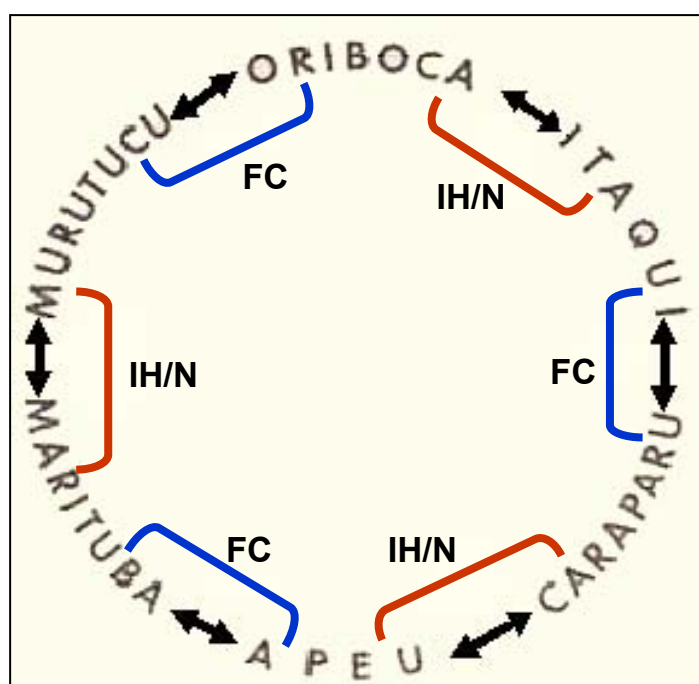


Figura 2 - Representação esquemática do padrão de relacionamento antigênico dos vírus do grupo C isolados na Amazônia Brasileira . Barras em azul e vermelho indicam os pares antigênicos estabelecidos pelos testes de FC, IH e/ou N. Fonte: Adaptado de Shope & Causey, 1962.

1.2.3 Distribuição geográfica

Os arbovírus pertencentes ao grupo C encontram-se distribuídos em países das Américas do Sul (Brasil, Peru, Equador, Venezuela, Suriname e Guiana Francesa), Central (Panamá, Trinidad, Honduras e Guatemala) e Norte (México e Estados Unidos) (Figura 3). Alguns membros têm sido encontrados somente em determinados países, tais como os VMAD e VOSSA no Panamá; VAPEU e VBRC no Brasil; VVIN no Equador; e VGL nos Estados Unidos, enquanto outros, apresentam uma distribuição mais ampla, como os VCAR, VITQ, VORI e VMUR também encontrados no Peru, Venezuela, Guiana Francesa e Trinidad. A taxa de anticorpos para esses arbovírus, observada na população humana de diferentes países das Américas Central e do Sul é bastante variável sendo verificada uma prevalência para anticorpos inibidores da hemaglutinação entre 0% e 40% (Pinheiro, 1981; Karabatsos, 1985; Shope *et al.*, 1988)

1.2.4 Hospedeiros vertebrados e Invertebrados

Estudos de campo realizados em áreas de florestas brasileiras e de Trinidad, colaboraram decisivamente para a compreensão do ciclo de transmissão dos vírus do grupo C no que se refere ao conhecimento dos vetores e hospedeiros naturais envolvidos na manutenção desses vírus em natureza (Shope *et al.*, 1988).

Uma grande diversidade de hospedeiros invertebrados e vertebrados encontra-se envolvida no ciclo natural de manutenção e

transmissão dos vírus do grupo C. Dentre os hospedeiros invertebrados, mosquitos pertencentes ao gênero *Culex*, principalmente ao subgênero *Melanoconium* (*Cx. Mel. vomerifer*, *Cx. Mel. portesi*, *Cx. Mel. spissipis*, *Cx. Mel. taeniopus*, *Cx. Mel. sacchettae* e outros pertencentes ao complexo *aikenii*) , são reconhecidos como vetores potenciais para estes agentes virais. Ressalte-se que outras espécies de culicídeos (*Cx. coronator*, *Cx. nigripalpus*, *Cx.(Eubonnea) accelerans*, *Cx (Eu.) amazonensis*, *Aedes arborealis*, *Ae. septemstriatus*, *Ae. taeniorhyncus*, *Limatus durharnii*, *Wyeomyia medioalbipes*, *Coquillettidia venezuelensis*, *Coquillettidia arribalzagai*, *Mansonia spp*, *Psorophora ferox* e *Sabethini*) também são vetores para os vírus do grupo C.

Em relação aos hospedeiros vertebrados, roedores pertencentes aos gêneros *Proechimys* (*Proechimys guyanensis* e *Proechimys semispinosus*) , *Oryzomys* (*Oryzomys capito* e *Oryzomys laticeps*), *Nectomys* (*Nectomys squamipes*), *Zygodontomys* (*Zygodontomys brevicauda*), *Sigmodon* (*Sigmodon hispidus*), *Heteromys* (*Heteromys anomalus*) e certos marsupiais membros dos gêneros *Didelphis* (*Didelphis marsupialis*), *Marmosa* (*Marmosa cinerea*, *Marmosa murina*) e *Caluromys* (*Caluromys phylander*) são os mais comumente implicados no ciclo de manutenção dos vírus do grupo C. Dois dos 13 membros do grupo C, o VNEP e VCAR têm sido isolados de espécies de morcegos *Artibeus literatus* e *Artibeus jamaicensis* (Tabela 3).



Figura 3 – Distribuição geográfica dos vírus do Grupo C nas Américas.

Tabela 3 – Hospedeiros invertebrados e vertebrados dos vírus do grupo C .

| Vírus | Artrópodes | | | Vertebrados | | |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | Gênero <i>Culex</i> (Cx.) | | Outros culicídeos | Marsupiais | Roedores | Outros mamíferos |
| | <i>Cx. Melanoconium</i> (Mel.) | Outros <i>Culex</i> | | | | |
| Caraparu | complexo aikenii | <i>Cx. coronator</i> | <i>Limatus durhamii</i> | | <i>Oryzomys capito</i> | <i>Artibeus literatus*</i> |
| | <i>Cx. (Mel.) spissipes</i> | <i>Cx. nigripalpus</i> | <i>Wyeomyia medioalbipes</i> | | <i>Oryzomys laticeps</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | <i>Cx. (Eubonnea) accelerans</i> | Sabethini | | <i>Proechimys guyanensis</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> | <i>Cx. (Eu.) amazonensis</i> | | | <i>Nectomys squamipes</i> | |
| | | | | | <i>Zygodontomys brevicauda</i> | |
| | | | | | <i>Heteromys anomalus</i> | |
| Apeu | complexo aikenii | | <i>Aedes arborealis</i> | <i>Caluromys phylander</i> | | |
| | <i>Culex sp</i> | | <i>Aedes septemstriatus</i> | <i>Marmosa cinerea</i> | | |
| Marituba | complexo aikenii | | | <i>Didelphis marsupialis</i> | | |
| | <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | | | <i>Caluromys phylander</i> | | |
| | <i>Culex sp</i> | | | | | |
| Murutucu | <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | <i>Culex sp</i> | <i>Coquillettidia venezuelensis</i> | <i>Didelphis marsupialis</i> | <i>Oryzomys capito</i> | |
| | complexo aikenii | | Sabethini | <i>Marmosa cinerea</i> | <i>Proechimys guyanensis</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> | | | | <i>Nectomys squamipes</i> | |
| Oriboca | <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | <i>Culex sp</i> | <i>Aedes taeniorhyncus</i> | <i>Marmosa cinerea</i> | <i>Oryzomys capito</i> | |
| | complexo aikenii | | <i>Coquillettidia venezuelensis</i> | <i>Didelphis marsupialis</i> | <i>Proechimys guyanensis</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) spissipes</i> | | <i>Coquillettidia aribalzagai</i> | | <i>Nectomys squamipes</i> | |
| | | | <i>Mansonia spp</i> | | | |
| | | | <i>Psorophora ferox</i> | | | |
| | | | Sabethini | | | |
| Itaqui | <i>Cx. (Mel.) spissipes</i> | <i>Culex sp</i> | | <i>Marmosa murina</i> | <i>Oryzomys capito</i> | |
| | complexo aikenii | | | <i>Metachirus nudicaudatus</i> | <i>Proechimys guyanensis</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | | | | <i>Nectomys squamipes</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> | | | | | |
| Bruconha | <i>Cx. (Mel.) sacchettiae</i> | | | | | |
| Nepuyo | <i>Cx. (Mel.) iolambdis</i> | <i>Cx. (Eubonnea) accelerans</i> | | | gênero <i>Proechimys</i> | <i>Artibeus literatus*</i> |
| | | | | | gênero <i>Nectomys</i> | <i>Artibeus jamaicensis*</i> |
| Restan | <i>Cx. (Mel.) portesi</i> | <i>Culex sp</i> | | | | |
| Madrid | <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> | | | | <i>Proechimys semispinosus</i> | |
| Ossa | <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> | | | | <i>Proechimys semispinosus</i> | |
| | <i>Cx. (Mel.) taeniopus</i> | | | | | |
| Gumbo Limbo | <i>Culex sp</i> | | <i>Aedes taeniorhyncus</i> | | <i>Sigmodon hispidus</i> | |
| Vinces | <i>Cx. (Mel.) vomerifer</i> | | | | | |

Fonte: Shope *et al.*, 1988. *Isolamentos de morcegos. Os vírus Bruconha, Restan e Vincés não foram isolados de vertebrados silvestres.

1.2.5 Ciclos de transmissão.

Os vírus do grupo C são basicamente mantidos em natureza mediante dois ciclos silvestres de transmissão: um ciclo que ocorre ao nível da copa das árvores cuja transmissão dos vírus é realizada principalmente por mosquitos culicídeos que infectam marsupiais durante o repasto sanguíneo, e outro ciclo que ocorre ao nível do solo, sendo neste último, a transmissão viral mantida entre culicídeos e roedores. Evidências ecológicas e epidemiológicas apontam para a existência de fatores que servem de elo que interligam estes dois ciclos silvestres, tornando-os dinâmicos entre si. Tais fatores referem-se à co-existência de hospedeiros vertebrados, invertebrados e dos vírus do grupo C em um ecossistema compacto, uma vez que um mesmo vírus pode infectar diferentes hospedeiros invertebrados e vertebrado. (Shope *et al.*, 1988).

Um terceiro ciclo, envolvendo humanos, pode ocorrer circunstancialmente, quando o homem adentra a floresta e se torna infectado. Neste caso, o homem passa a se comportar como um hospedeiro incidental. Entre os vírus do grupo C, alguns membros tais como os VCAR e VITQ parecem estar mais associados a roedores terrestres. Por outro lado, os VAPEU e VMTB parecem ser mantidos mediante um ciclo ao nível da copa das árvores envolvendo marsupiais como hospedeiros vertebrados e mosquitos de copa, principalmente da espécie *Culex (Mel.) portesi* como hospedeiro invertebrado (Toda & Shope, 1965; Pinheiro, 1981; Hervé *et al.*, 1986; Shope *et al.*, 1988) (Figura 4).

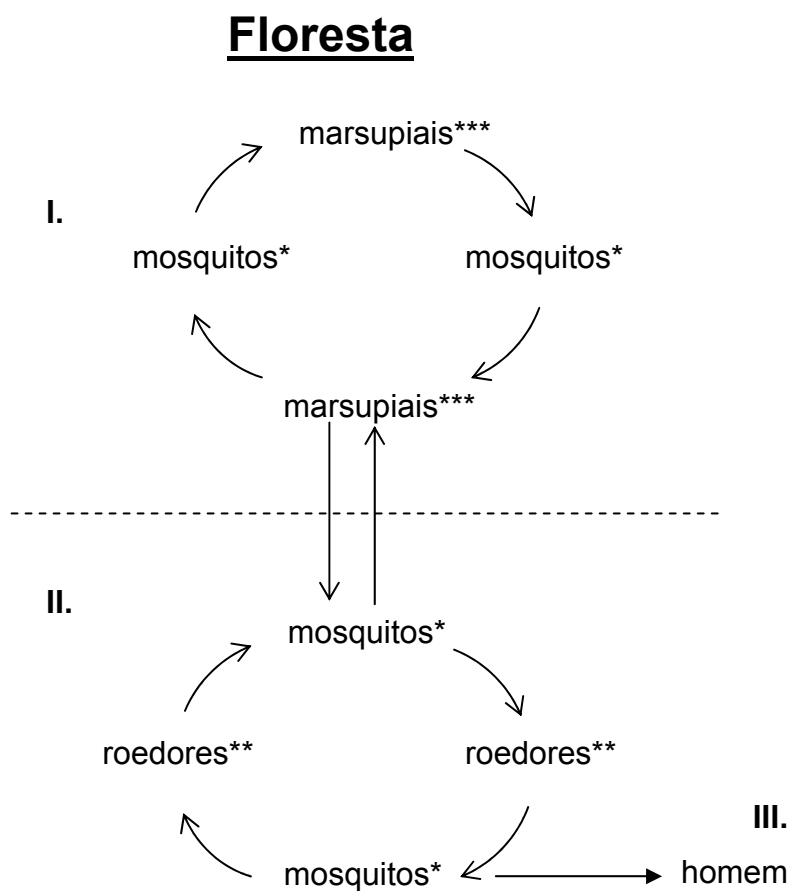


Figura 4 – Ciclos silvestres de transmissão dos vírus do grupo C. I) Ciclo na copa; II) Ciclo no solo; III) Ciclo circunstancial envolvendo o homem como hospedeiro vertebrado. * mosquitos do gênero *Culex*, subgênero *Melanoconium*; ** roedores pertencentes aos gêneros *Oryzomys*, *Proechimys*, *Nectomys* e *Zigodontomys*; *** marsupiais pertencentes aos gêneros *Marmosa*, *Didelphis* e *Caluromys*. Fonte: Adaptado de Toda & Shope, 1965.

1.2.6 Infecção experimental em animais e estudos de patologia.

Em animais silvestres e domésticos naturalmente infectados com os vírus do grupo C não existe, até o momento, relato de doença. Em animais de laboratório, a infecção experimental de camundongos albinos *Swiss* recém-nascidos (1-3 dias) inoculados via intracerebral (IC) e/ou intraperitoneal (IP) mostrou que esses animais tornam-se infectados, desenvolvem viremia e morrem. Particularmente, os VCAR, VMUR e VORI matam camundongos adultos rapidamente após inoculação IP e IC. Comparativamente, os VAPEU, MVTB, VITQ e VNEP parecem ser menos agressivos quando inoculados pela via IC. Em relação a inoculação pela via IP, esses vírus matam poucos ou nenhum animal (Causey *et al.*, 1961).

Utilizando hamsters como modelo experimental, pode-se observar que para esses animais os VCAR, VORI e VITQ são letais mesmo quando inoculados pela via subcutânea (SC) (Pinheiro, 1981; Karabatsos, 1985;). Em relação a macacos rhesus (*Macaca mulatta*) e roedores silvestres, estes animais parecem mostrar quadro virêmico irregular.

De fato, grupos de macacos rhesus e roedores (*Zigodontomys brevicauda* e *Oryzomys laticeps*) quando inoculados pela via SC evidenciaram padrões de curvas virêmicas distintas sugerindo que fatores inter e intraespecíficos (espécie, sexo, idade, peso, estado nutricional) parecem afetar na produção de viremias nesses animais. Em adição, a inoculação do VMTB pela via SC em quatro preguiças (*Bradypus trydactylus*) resultou em produção de viremia em todos os animais, sendo que destes, três evoluíram para morte (Karabatsos, 1985)

Em termos de patologia, estudos experimentais realizados em camundongos e preguiças (*Bradypus trydactylus*) mostraram que os vírus do grupo C são pantrópicos atingindo órgãos como fígado e baço, sendo também detectados no cérebro e musculatura esquelética evidenciando a presença de neurotropismo e miotropismo (Pinheiro, 1981). Na década de 1960, de Paola consolidou as bases patológicas para esses vírus observando lesões hepáticas severas em camundongos, lesões estas comparáveis às causadas pelo vírus da febre amarela (de Paola *et al.*, 1963).

O estudo histopatológico realizado em camundongos caracterizou as principais lesões ao nível dos sistemas nervoso e muscular, bem como no fígado desses animais. A descrição das lesões no sistema nervoso central foi caracterizada por tumefações, retração, necrose, esponjiação e degeneração neuronal. No tecido muscular estriado observaram-se alterações nas fibras musculares (atrofia ou retração, perda das estriações, hialinização ou tumefação) e dissociação das fibras musculares por edema intersticial, encontrando-se no interstício detritos de células conjuntivas necrosadas (de Paola *et al.*, 1963; Dias, 1982)

1.2.7 Infecção em humanos: aspectos clínicos e patológicos

Dos 13 vírus que compõem o grupo C dos arbovírus, dez (VORI, VITQ, VCAR, VAPEU, VMTB, VMUR, VNEP, VOSSA, VMAD e VRES) já foram isolados de amostras de sangue de pacientes febris (Causey *et al.*, 1961; Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Vasconcelos *et al.*, 1998). As pessoas infectadas apresentaram sintomatologia clínica caracterizada principalmente

por febre elevada (38°C a 40°C) e cefaléia intensa. Vertigem, dores lombares, mialgia e/ou artralgia foram reportados em 2/3 dos casos. Menos freqüentes náuseas e fotofobia têm sido registradas em apenas 1/3 dos pacientes. A febre permanece de 2 a 5 dias, e em algumas vezes apresenta-se bifásica. A presença de exantema ainda não foi relatada em pacientes infectados pelos vírus do grupo C. Dados laboratoriais revelaram, em alguns casos, leucopenia. Alterações patológicas e anormalidades neurológicas não têm sido relatadas. Os pacientes convalescem após um período de uma a duas semanas sem apresentar seqüelas (Causey *et al.*, 1961; Pinheiro, 1981; Shope *et al.*, 1988).

Parece não haver relação entre suscetibilidade aos vírus do grupo C em função da raça e sexo dos indivíduos infectados, porém parece haver predominância dos casos febris em pessoas expostas mais intensamente às áreas com risco de transmissão, sendo adultos jovens do sexo masculino os mais freqüentemente atingidos. Não se conhece a relação infecção aparente-inaparente entre os infectados. A prevalência de anticorpos para os vírus do grupo C está diretamente relacionada ao grau de exposição ao nicho ecológico desses agentes. Anticorpos IH para o grupo C têm sido demonstrados variando o percentual de positividade de acordo com a localidade (Pinheiro, 1981).

1.2.8 Diagnóstico e tratamento de infecções humanas

O diagnóstico laboratorial das arboviroses, em geral é feita inicialmente pela tentativa de isolamento viral em camundongos recém nascidos (1-3 dias) a partir do soro e sangue de pacientes na fase aguda da doença (geralmente até 3 dias após o início dos sintomas). Para identificação

do grupo, suspensões preparadas a partir de cérebro ou fígado de camundongos são utilizadas como antígenos em testes de FC contra os soros hiperimunes dos grupos de arbovírus existentes na área geográfica em questão. Para a identificação dos tipos específicos, devem-se usar os testes de IH ou N (Shope & Sather, 1979; Pinheiro *et al.*, 1986).

Semelhante aos demais arbovírus, não existe tratamento específico para o quadro clínico causado pelos vírus do grupo C, sendo recomendado o tratamento sintomático associado ao repouso, hidratação constante e uso de drogas analgésicas e antipiréticas (Pinheiro, 1981).

1.2.9 Microscopia eletrônica, propriedades físico-químicas e biológicas

Estudos ao nível de microscopia eletrônica para os VMTB, VORI, VMUR, VCAR, VITQ e VNEP realizados por Kitajima *et al.* (1982), mostraram que as partículas desses vírus são esféricas medindo entre 80 a 110 nm de diâmetro, sendo envolvidas por um envelope lipídico (Figura 5).

O envelope viral deriva de membranas do complexo de Golgi, e ocasionalmente da membrana plasmática celular. Internamente, a partícula viral encerra três segmentos de ácido ribonucléico (ARN) de tamanhos diferentes e que se encontram, individualmente, ligados a uma proteína L (possível polimerase viral) e circundados por uma proteína denominada N (nucleocapsídeo), originando deste modo três nucleoproteínas (Murphy *et al.*, 1973; Murphy, 1996; Büchen-Osmond, 2003) (Figura 6).

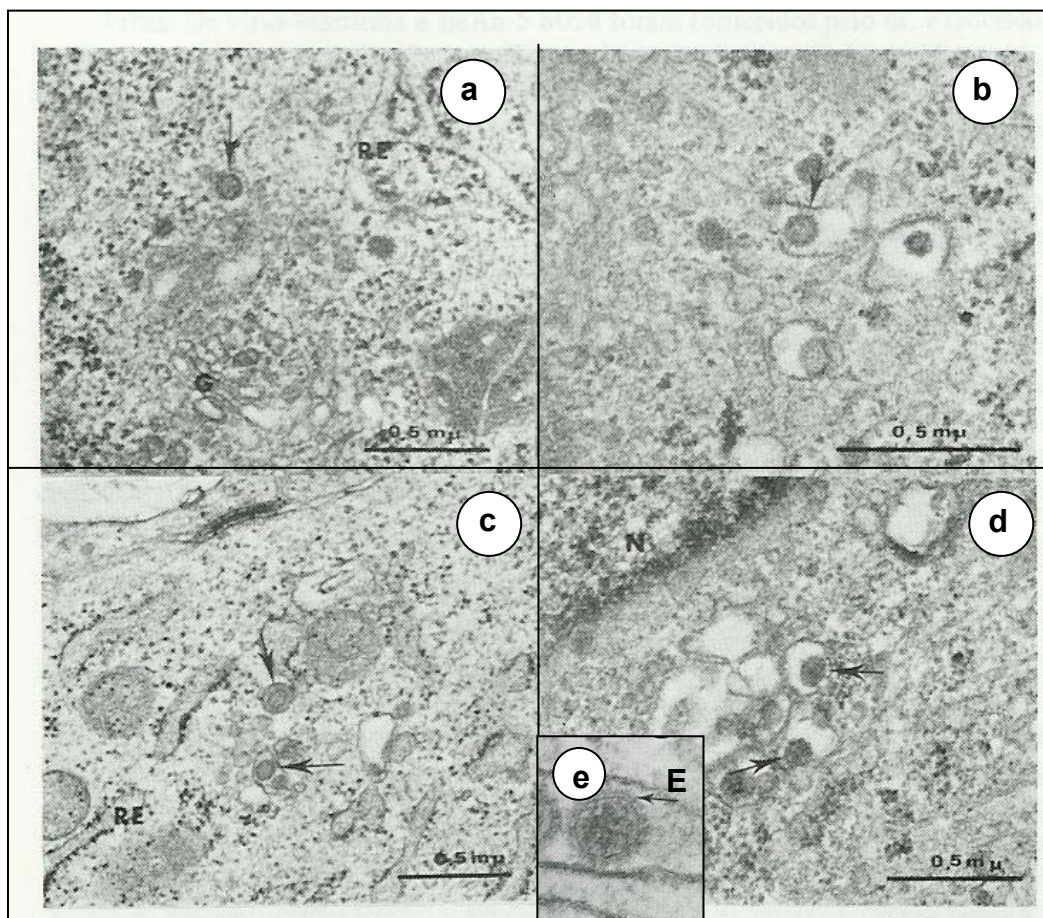


Figura 5 – Microscopia eletrônica dos vírus do grupo C: diversos aspectos das partículas virais (setas) em vesículas citoplasmáticas frequentemente associadas ao complexo de Golgi (G); letras (a) e (b) – VAPEU; (c) – VNEP; (d) – VMUR; (e)- partícula do VMUR em maior aumento evidenciando o envelope lipídico (E); N – núcleo celular; RE – retículo endoplasmático. Fonte: Adaptado de Kitajima *et al.* (1982).

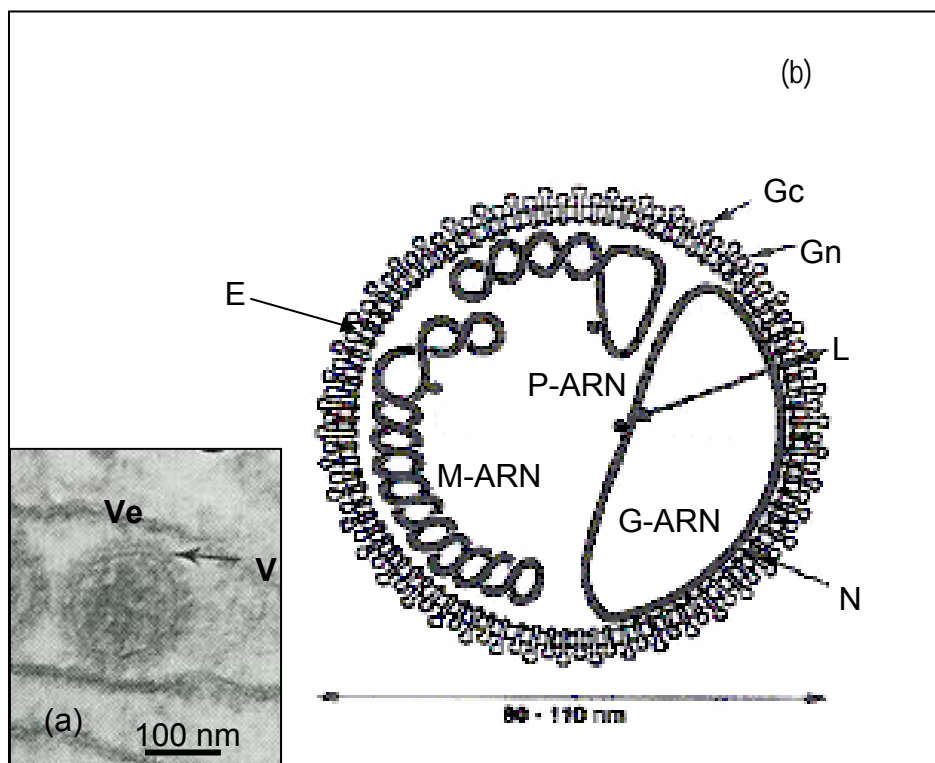


Figura 6 – Partícula dos vírus do grupo C. (a) microscopia eletrônica da partícula do VMTB (V) observada no interior de uma vesícula citoplasmática (Ve) de células VERO infectadas; (b) representação esquemática da partícula viral evidenciando os três segmentos de ARN (P-ARN, M-ARN e G-ARN) associados a proteína L. Circundando cada molécula de ARN, observa-se a proteína N, e as duas glicoproteínas Gn e Gc emergindo do envelope (E).
 Fonte: Adaptado de Bouloy, 1991.

Apesar de não haver estudos específicos em nível físico-químico para os vírus do grupo C, acredita-se que esses vírus se assemelhem aos demais ortobunyavírus apresentando massa molecular estimada em aproximadamente 300-400 x 10⁶ kDa com coeficientes de sedimentação em gradientes de sucrose e CsCl entre 1,16 – 1,18 e 1,20 – 1,21 g/cm³ , respectivamente. Os vírus são sensíveis ao calor, bem como a solventes lipídicos, detergentes (hipoclorito de sódio) e formaldeído. A partícula viral apresenta cerca de 20% a 30% de lipídios em relação ao seu peso total, sendo a quase totalidade destes componentes, incluindo fosfolipídios, esteróis, ácidos graxos e glicolípideos, derivados da membrana onde ocorre à maturação viral. Os carboidratos correspondem entre 2% a 7% do peso total do vírus (Bishop *et al.* 1980; Bishop, 1990)

Estudos de infecção experimental em células VERO, evidenciaram que os vírus do grupo C são capazes de se replicar nesse tipo celular sendo as partículas virais observadas tanto intra quanto extracelularmente. Os efeitos celulares causados pelos vírus do grupo C são comuns a outros arbovírus, sendo descritos como arredondamento, aumento de densidade e vacuolização citoplasmática, comprometendo dessa forma, a fisiologia celular normal (Kitajima *et al.*, 1982). Em relação às células de invertebrados, nenhum estudo foi realizado para os membros do grupo C, no entanto, acredita-se que assim como para os demais ortobunyavírus pouco ou nenhum efeito citopatogênico (ECP) seja observado (Schmaljohn & Patterson, 1990; Schmaljohn & Patterson, 1991; Schmaljohn & Hooper, 2001)

1.2.10 Ácido nucléico

Os vírus do grupo C, assim como a grande maioria dos arbovírus, excetuando-se o vírus da peste suína africana que possui genoma constituído por ácido desoxirribonucléico (ADN), apresentam seu genoma composto por três segmentos de ARN, fita simples, polaridade negativa, denominados Grande (G-ARN), Médio (M-ARN) e Pequeno (P-ARN), os quais são responsáveis pela formação das proteínas estruturais de nucleocapsídeo (N) e glicoproteínas de superfície (Gn e Gc), bem como das proteínas não estruturais NSs, NSm e L, esta última uma possível polimerase viral ARN dependente. O tamanho do genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* varia de acordo com o tipo de segmento. Para os segmentos P-ARN, M-ARN e G-ARN, o comprimento em número de nucleotídeos (nt) varia de 850 nt a 1000 nt, de 4300 nt a 4800 nt, e de 6000 nt a 7500 nt, respectivamente (Elliott, 1985; Lees *et al.*, 1986; Elliott, 1989a; Elliott, 1989b; Elliott & McGregor, 1989; Elliott, 1990; Bouloy, 1991; Elliott *et al.*, 2000).

Os três fragmentos de ARN genômicos apresentam ao longo de suas extremidades 3' e 5' localizadas em regiões não codificantes (RNC), onze nt altamente conservados e complementares, o que proporciona circularização e a conformação helicoidal das moléculas de ARN, proporcionando conseqüentemente, um melhor acomodamento espacial no interior da estrutura viral (Figura 7) (Clerx-Van Haaster & Bishop, 1980; Clerx-Van Haaster *et al.*, 1982a; Clerx-Van Haaster *et al.*, 1982b; Raju & Kolakofsky, 1989).

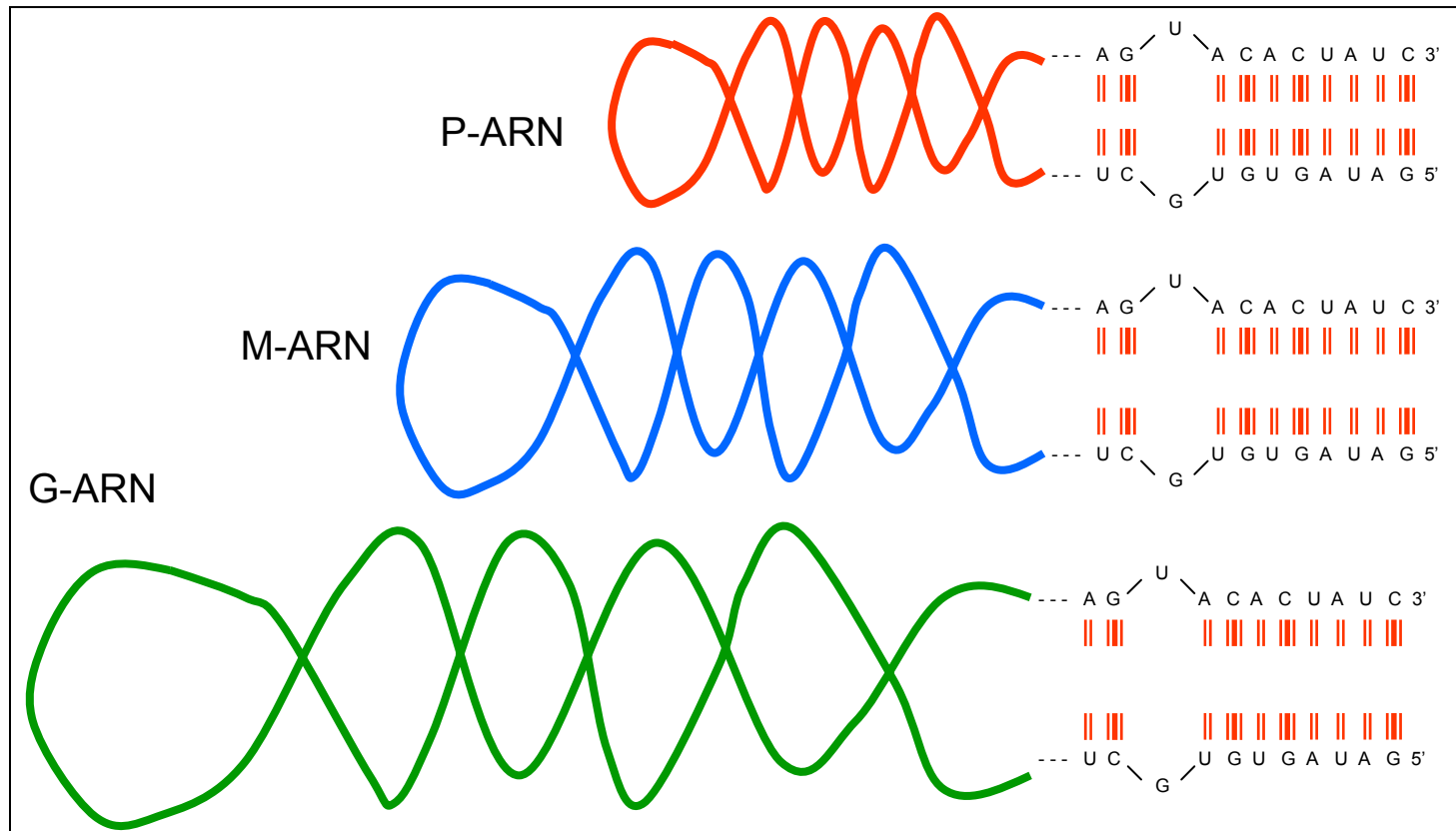


Figura 7 – Representação esquemática das moléculas de ARN (P-ARN, M-ARN e G-ARN) dos ortobunyavírus. Observar os nucleotídeos altamente conservados e complementares ao nível da região terminal 3'e 5' não codificante. Fonte: Adaptado de Bouloy, 1991.

1.2.11 Organização genômica

Os ortobunyavírus apresentam ao longo de seus segmentos de ARN genes orientados no sentido 3' → 5' que codificam proteínas estruturais e/ou não estruturais em suas seqüências complementares. O segmento G-ARN codifica em uma única cadeia aberta de leitura (CAL), a proteína L, a maior proteína dos ortobunyavírus, uma possível ARN polimerase ARN dependente com massa molecular média de 260kDa e que se encontra associada aos três segmentos de ARN viral. Em relação ao segmento M-ARN, o mesmo codifica em uma única CAL, uma grande poliproteína, que após clivagem co-translacional origina três proteínas virais, sendo duas glicoproteínas estruturais de superfície denominadas Gn (29KDa – 41 KDa) e Gc (108 KDa – 125 KDa) e uma proteína não estrutural denominada NSm (11KDa -17KDa) (Fazakerley *et al.*, 1988; Raju & Kolakofski, 1989). O segmento P-ARN codifica ao longo de duas CALs superpostas, uma proteína estrutural de nucleocapsídeo (N; 19KDa e 26KDa) que circunda cada um dos segmentos de ARN genômicos, e uma proteína não estrutural denominada NSs (10KDa - 12KDa) (Fenner & White, 1994; Büchen-Osmond, 2003) (Figura 8). As proteínas virais descritas acima, estão implicadas a importantes propriedades biológicas dos ortobunyavírus, tais como: antigenicidade (processo que estimula a produção de anticorpos neutralizantes, fixadores de complemento e inibidores da hemaglutinação), virulência (grau de severidade da doença) e a infectividade em vertebrados e invertebrados (interação vírus-célula hospedeira) (Gonzales-Scarano *et al.*, 1989; Bouloy, 1991; Büchen-Osmond, 2003).

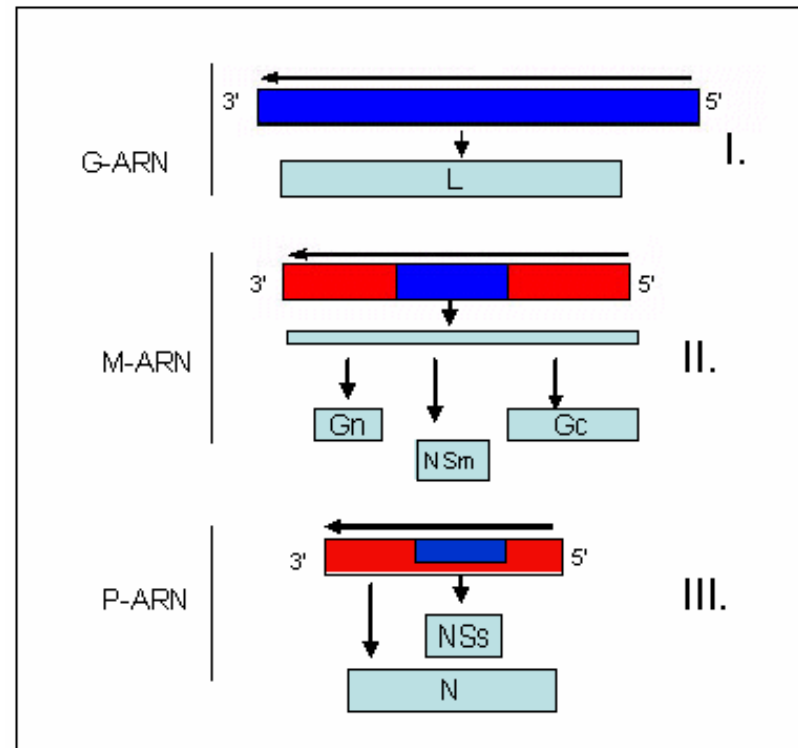


Figura 8 – Organização genômica dos ortobunyavírus. Segmentos de ARN polaridade negativa. I: segmento G-ARN dando origem a proteína L, possível polimerase viral; II: segmento M-ARN, inicialmente originando uma poliproteína que por clivagem cotranslacional origina as duas proteínas glicoproteínas de superfície (Gn e Gc) e uma proteína não estrutural, NSs; III: segmento P-ARN com duas cadeias abertas para leitura superpostas que dão origem a uma proteína de nucleocapsídeo N e uma proteína não estrutural NSs. Fonte: Adaptado de Bouloy, 1991.

1.3 REARRANJO GENÉTICO: MECANISMO DE EVOLUÇÃO ENTRE OS ORTOBUNYAVÍRUS

A evolução dos vírus ARN segmentados de polaridade negativa ocorre basicamente por três mecanismos: mutação, rearranjo genético e recombinação genética (Gentsch & Bishop, 1976a; Gentsch & Bishop, 1976b; Gentsch *et al.*, 1980; Bishop & Beaty, 1988; Pringle, 1996; Holland & Domingo, 1998; Schmaljhon & Hooper, 2001; Archer & Ricco-Hesse, 2002; Charrell *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2002). No entanto, a contribuição de cada um desses mecanismos para a biogênese dos vírus pertencentes à família *Bunyaviridae* ainda é desconhecida levando a uma importante perda de informação genética para um grande número de membros dessa família. A família *Bunyaviridae* é considerada uma das maiores famílias virais composta por mais de 330 vírus, incluindo agentes de grande relevância veterinária (*Akabane*) e em saúde pública para humanos, como os vírus *Rift Valley*, *Crimean Congo*, *Oropouche*, *La Crosse* e *Garissa*, dentre outros (Elliott *et al.*, 2000; Nichol, 2001; Woods *et al.*, 2002; Büchen-Osmond, 2003).

O rearranjo genético entre membros da família *Bunyaviridae* tem sido demonstrado ocorrer tanto em culturas celulares quanto em hospedeiros artrópodes co-infectados, bem como pela análise de isolamentos virais ocorridos naturalmente (Bishop & Beaty, 1988; Beaty *et al.*, 1997; Borucki *et al.*, 1999; Bowen *et al.*, 2001). Enquanto a recombinação genética entre os vírus ARN segmentados de polaridade negativa parece ser um mecanismo relativamente raro (Holland & Domingo, 1998), exemplos de rearranjo genético têm sido recentemente descritos para determinados membros da família

Bunyaviridae, gênero *Orthobunyavirus*, tais como os vírus *Oropouche* e *Garissa* (Saeed *et al.*, 2000; Saeed *et al.*, 2001, Gerrard *et al.*, 2004).

Atualmente com o advento da tecnologia biomolecular como a amplificação gênica por meio da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) usando-se a transcrição reversa (RT), clonagem e seqüenciamento, está sendo possível estudar casos de rearranjo genético ocorridos em natureza que corroboram com os achados prévios decorrentes da observação precisa de pesquisadores que utilizavam tão somente a associação de dados epidemiológicos, ecológicos e antigênicos sobre esses vírus para inferirem suas conclusões.

De fato, segundo Shope *et al.* (1988), os vírus do grupo C constituem um dos melhores modelos destinados ao estudo de rearranjo genético que ocorre em natureza. As conclusões de Shope foram baseadas principalmente em dois fatores: i) transmissão desses vírus em ecossistema compacto, o que pode favorecer a co-infecção de mosquitos e/ou pequenos mamíferos com dois vírus pertencentes ao mesmo grupo, e ii) padrão complexo de relação antigênica evidenciado para alguns vírus do grupo C, isolados em florestas brasileiras. Nestes termos, o estudo do relacionamento antigênico dos vírus do grupo C, em suas bases genéticas, pode vir a explicar e contribuir para enriquecer o conhecimento sobre o rearranjo viral em natureza como mecanismo de evolução entre os ortobunyavírus.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Caracterização molecular dos vírus do grupo C pertencentes à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, bem como correlacionar os achados genéticos aos dados eco-epidemiológicos, ecológicos e antigênicos, contribuindo dessa forma para um melhor entendimento sobre a epidemiologia molecular dos ortobunyavírus do grupo C.

1.4.2 Objetivos específicos

- Descrição da organização genômica referentes aos segmentos P-ARN e M-ARN;
- Comparação das seqüências nucleotídicas obtidas para os vírus do grupo C com seqüências previamente descritas para outros ortobunyavírus pertencentes aos grupos California, Simbu e Bunyamwera utilizando métodos de análise filogenética;
- Verificar a possibilidade de existência de rearranjo genético em natureza entre os vírus do grupo C, mediante análise das árvores filogenéticas obtidas para os segmentos de ARN estudados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

O total de trinta amostras, dentre espécies e subespécies dos vírus do grupo C, isoladas de diferentes hospedeiros (humanos, artrópodes, vertebrados silvestres e animais sentinelas), obtidos de diferentes regiões das Américas entre 1954 e 1999 (Tabela 4), foram gentilmente cedidas pelo Centro de Referência para Arbovírus sediado no Instituto Evandro Chagas, Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Belém, Pará, Brasil, e pelo Centro de Referência Internacional para Arbovírus e Doenças Infecciosas Emergentes, na Universidade do Texas, Departamento de Patologia, Galveston, Texas, Estados Unidos, correspondendo a vírus liofilizados após isolamento em camundongos recém-nascidos seguidos de uma passagem em cultura de células VERO.

2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DO GRUPO C

A caracterização molecular dos vírus do grupo C incluiu basicamente etapas de: i) propagação dos vírus em cultura de células VERO (linhagem E-6) para produção de estoque viral; ii) extração do ácido nucléico (ARN); iii) detecção e amplificação do ARN viral pela técnica de RT-PCR; iv) visualização do produto da RT-PCR e purificação do ADN complementar (cADN); v) clonagem do produto da RT-PCR e purificação do cADN clonado; e v) seqüenciamento.

Tabela 4 - Amostras dos virus do grupo C usadas no estudo evidenciando os respectivos números de identificação, localidade (país), hospedeiro, e ano isolamento.

| Amostra viral | Número de identificação | País | Hospedeiro | Ano |
|--------------------|-------------------------|-----------------|----------------------------------|------|
| <i>Oriboca</i> | BeAn 17 | Brasil | <i>Cebus apella</i> | 1954 |
| | BeAn 263748 | Brasil | <i>Oryzomys goeldi</i> | 1974 |
| | BeAr 246614 | Brasil | <i>Culex taeniopus</i> | 1973 |
| | BeH 142102 | Brasil | humano | 1968 |
| | LCVP 217 | Guiana Francesa | humano | 1977 |
| <i>Murutucu</i> | BeAn 974 | Brasil | <i>Cebus apella</i> | 1955 |
| | IQU 126 | Peru | humano | 1999 |
| | IQU 9891 | Peru | humano | 1999 |
| | BeH 257944 | Brasil | humano | 1974 |
| <i>Caraparu</i> | BeAn 3994 | Brasil | <i>Cebus apella</i> | 1956 |
| | BeH 190863 | Brasil | humano | 1970 |
| | IQU 212 | Peru | humano | 1995 |
| | BeAr 299789 | Brasil | <i>Culex portesi</i> | 1975 |
| | BeH 5546 | Brasil | humano | 1956 |
| <i>Marituba</i> | BeAn 15 | Brasil | <i>Cebus apella</i> | 1954 |
| | BeAn 258481 | Brasil | <i>Caluromys</i> sp | 1974 |
| | BeH 119190 | Brasil | humano | 1980 |
| | BeAr 186247 | Brasil | <i>Culex melanoconium</i> sp | 1970 |
| <i>Nepuyo</i> | TRVL 18462 | Trinidad | <i>Culex(Aedinus) accelerans</i> | 1957 |
| | BeAn 10709 | Brasil | Camundongos sentinelas | 1959 |
| | BeAr 225808 | Brasil | <i>Culex</i> sp | 1972 |
| | BeAn 275424 | Brasil | <i>Nectomys squamipes</i> | 1969 |
| <i>Itaqui</i> | BeAn 12797 | Brasil | camundongos sentinelas | 1959 |
| | BeAn 346113 | Brasil | <i>Cebus apella</i> | 1974 |
| <i>Apeu</i> | BeAn 848 | Brasil | <i>Cebus apella</i> | 1955 |
| <i>Bruconha</i> | 77V-74814 | Brasil | Camundongos sentinelas | 1977 |
| <i>Ossa</i> | BT 1820 | Panamá | humano | 1961 |
| <i>Gumbo Limbo</i> | FE-3 71H | Estados Unidos | <i>Culex (Melanoconium)</i> | 1963 |
| <i>Restan</i> | TRVL 51144 | Trinidad | humano | 1963 |
| <i>Madrid</i> | BT 4075 | Panama | humano | 1961 |
| <i>Vinces</i> | 75V-807 | Equador | <i>Culex (Mel.) vomerifer</i> | 1974 |

2.2.1 Propagação viral em cultura de células VERO-E6 (células renais de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*)

Frascos de 75 cm² estéreis foram utilizados para preparação de monocamada celular. A cada frasco, previamente lavado com solução de PBS estéril pH 7,4 contendo 5% de penicilina (100 mg/mL), adicionaram-se 29 mL de meio MEM de crescimento enriquecido com SBF a 5%, L-Glutamina 1% e antibióticos (penicilina e estreptomicina 1%) e 2% de NaHCO₃; e 1 mL de suspensão de células VERO-E6, sendo os frascos posteriormente incubados a 37°C na presença de CO₂ durante 2-3 dias ou até a formação de uma monocamada celular confluenta. Após a formação da monocamada celular, o meio de crescimento foi completamente retirado dos frascos, e as células foram infectadas pela inoculação de aproximadamente 35 U.F.P de vírus por células no interior de cada frasco. Os mesmos foram incubados durante 1 hora a 37°C objetivando a adsorção dos vírus à monocamada celular. Após esse período, 10 mL de meio MEM de manutenção enriquecido com SBF a 2%, L-Glutamina 1% e solução de penicilina e estreptomicina a 1%, e 2% de NaHCO₃, foram adicionados, sendo então os frascos incubados a 37°C durante 2 a 5 dias ou até que 70 a 75% de ECP fosse observado, quando então os fluidos celulares contendo partículas virais foram coletados em tubos estéreis e usados para extração de ARN .

2.2.2 Precipitação e purificação viral

Os fluidos de células VERO E-6 infectados foram submetidos à precipitação e purificação viral (Ni & Barrett, 1995) tendo por objetivo isolar

partículas virais de organelas e detritos celulares das culturas.

Inicialmente, os sobrenadantes dos fluidos das células infectadas foram clarificados mediante centrifugação refrigerada (4°C a 8°C) a 5.000 rpm durante 10 minutos, para remoção dos restos celulares. Posteriormente, os fluidos clarificados foram precipitados em uma solução contendo 7% de PEG 8000 (Amersham Life Science) e 2,3% de NaCl a 4°C por 8 a 16 horas utilizando agitador automático e centrifugado a 6,000 rpm por 30 minutos a 4°C para precipitação das partículas virais. Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de tampão TN 20mM (pH 7,4) e NaCl 100mM, sendo em seguida submetidos a um gradiente contínuo de sacarose (20% a 70%) e centrifugados durante 60 minutos a 270.000 rpm a 4°C. As bandas correspondentes às partículas virais em suspensão foram coletadas com o auxílio de uma seringa (1mL), precipitadas em 10mL de solução de PEG 8000 a 50% e NaCl 23% mediante centrifugação a 3.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Os vírus purificados foram ressuspensos em 1 mL de tampão TN ou água livre de ribonuclease

2.2.3 Extração do ARN viral

Para obtenção do ARN viral a partir das partículas virais purificadas utilizou-se o *kit QIAamp®Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) conforme instruções do fabricante, cujo fundamento baseia-se nas propriedades seletivas de ligação do ARN a membranas de sílica-gel combinadas à centrifugação em alta velocidade (entre 8.000 e 14.000 rpm). Em microtubo estéril de 1,5 mL, adicionaram-se 140µL da amostra viral purificada a 560 µL de tampão de lise

(AVL) contendo substância carreadora de ARN. Em seguida, a solução foi misturada por agitação durante 15 segundos e incubada a TA por 10 minutos, tempo suficiente para que ocorresse a completa lise das partículas virais. Posteriormente, adicionaram-se 560 μ L de etanol (96-100%) misturando mediante agitação durante 15 segundos. Adicionaram-se cuidadosamente 630 μ L da mistura contendo a amostra viral, tampão AVL e etanol aos tubos coletores que possuem em seu interior colunas com membranas de sílica-gel. As amostras foram então centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto a TA, e o líquido dos tubos coletores foi descartado. Adicionou-se o restante da mistura ao tubo e uma nova centrifugação conforme descrito previamente foi realizada. Em seguida, adicionaram-se 500 μ L de tampão de precipitação AW1, sendo as amostras centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. O filtrado contido nos tubos coletores foram descartados, e o volume de 500 μ L do tampão de lavagem AW2 foi adicionado a coluna do tubo coletor. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos, o filtrado descartado, e uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 min foi realizada para eliminar possíveis traços do tampão AW2, uma vez que pequenas concentrações desse reagente podem interferir na amplificação do ARN. Os tubos coletores foram posicionados no interior de um microtubo de 1,5 mL estéril e devidamente identificado, sendo em seguida adicionado 50 μ L de tampão de eluição AVE. As amostras foram incubadas durante 1 minuto a TA e centrifugadas a 8.000 rpm para recuperação do ARN aderido à membrana de sílica-gel. O ARN obtido foi usado imediatamente para obtenção do ADN complementar (cADN) ou preservado a -70°C .

2.2.4 RT-PCR.

A técnica de RT-PCR em um único tubo foi utilizada para obtenção do cADN correspondente ao segmento P-ARN usando iniciadores específicos correspondentes aos 15 nucleotídeos altamente conservados ao nível dos terminos 3' e 5' dos segmentos de P-ARN dos vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* (Dunn *et al.*, 1994). As reações de RT-PCR foram realizadas para um volume final de 50 µL contendo 10 µL de ARN viral, 10 pmol do iniciador complementar BUN F (AGTAGTGTACTCCAC), 10 pmol do iniciador reverso BUN R (AGTAGTGTGCTCCAC), 1x tampão PCR (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM), MgCl₂ 2,5 mM, DTT 2,5 mM, 20u de inibidor de ribonuclease (RNase inhibitor ; Invitrogen), mistura de dNTPs 200 µM (Invitrogen), 1,125 u de ADN polimerase (*Platinum Taq DNA polymerase*, Invitrogen) e 1 U da enzima transcriptase reversa (*Superscript II Reverse Transcriptase*; Invitrogen). A RT foi processada inicialmente durante 60 minutos a 42°C, seguidas por 35 ciclos de PCR, cada um composto por etapas de desnaturação a 94°C por 40 segundos, hibridização dos iniciadores a 54°C por 40 segundos, e síntese a 72 °C por 1 minuto. O produto de RT-PCR para o segmento P-ARN dos vírus do grupo C foi estimado entre 800 e 900 pares de bases (pb).

Para a amplificação do segmento M-ARN, especificamente de parte do gene Gn, utilizou-se o protocolo convencional em duas etapas, onde inicialmente o ARN viral foi transcrito em um cADN e o produto da RT utilizado na PCR (Elliott & Mc Gregor, 1989; Saiki, 1990). A síntese do cADN foi realizada para o volume final de 20µL incluindo 5 µL de ARN viral (1ng-5µg) e

15µL da mistura de RT que contem tampão RT 1X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 0,1 M), 20 u de inibidor de ribonuclease (*RNAse inhibitor*, Invitrogen), mistura de dNTPs 200M (Invitrogen), 50-250 ng de iniciadores randômicos (Invitrogen) e 1 u da enzima transcriptase reversa (*Superscript II Reverse Transcriptase*; Invitrogen). A transcrição reversa foi processada durante 1 hora a 42°C. Em seguida, a reação de PCR foi realizada usando 2ng do produto da RT e uma mistura de reação de PCR contendo tampão PCR 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM), MgCl₂ 2,5 mM, mistura de dNTPs 200µM (Invitrogen), 10 pmol de cada iniciador degenerado BUN-GnF (AC[T/A]AAG[C/T]TATA[C/T]AG[A/G]TA[T/C]AT) e BUN-GnR (TGACATATG[C/T]TG[G/A]TT[A/G]AAGCA), 1,125 u de ADN polimerase (*Platinum Taq DNA Polymerase*, Invitrogen) cuja reação foi ajustada para o volume final de 50 µL. Os iniciadores degenerados foram desenhados tendo como base as seqüências nucleotídicas de ortobunyavírus pertencentes aos grupos Simbu (*Oropouche*, M: NC 005777; *Jatobal*, M: AF 312380), *Bunyamwera* (*Bunyamwera*, M: M11852; *Germiston*, M: M21951; *Cache Valley*, M: AF186243; *Fort Sherman*, M: AY593734; *Ngari*, M: AY593725) e *California* (*California encephalitis*, M: AF123483; *Lumbo*, M: AF123484; *San Angelo*, M: AF123486; *Inkoo*, M: U88059; *Jameston Canyon*, M: U88058; *La Crosse*, M: U18980; *Melao*, M: U88057; *Snowshoe hare*, M: K02539; *Serra do Navio*, M: AF 123490; *South River*, M: AF 123488; *Keystone*, M: AF 123489; *Jerry Slough*, M: AF123487), correspondente a posição entre os nucleotídeos 200 e 550, cujo produto amplificado foi estimado entre 300 e 350 pb.

2.2.5 Análise do produto da RT-PCR

Os produtos da RT-PCR foram analisados pelo método de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio utilizando aparato de eletroforese convencional e visualizados em transiluminador com emissão de raios UV. Esta técnica tem como fundamento a migração de moléculas de ADN do polo negativo para o positivo mediante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre dois pontos. A visualização dos fragmentos amplificados dá-se em virtude da propriedade de incorporação do brometo de etídio a moléculas de ADN fragmentadas e pela sua capacidade de liberar fluorescência ao ser excitada por raios ultravioletas (UV). O gel de agarose para análise foi preparado a 1,2% pela adição de 0,6g de agarose em pó (Gibco-BRL) a 50 mL de tampão TAE 1X (Tris 10mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1mM pH 7,2). Após completa dissolução do gel pelo aquecimento do mesmo em microondas durante tempo médio de 2 minutos seguido de resfriamento à temperatura de 50°C, adicionaram-se 5µL de brometo de etídio (0,5 µg/mL, Invitrogen) e aguardou-se completa solidificação do gel em plataforma apropriada. Os produtos amplificados foram migrados juntamente com um marcador de peso molecular (*Low DNA Mass - 100 bp ladder*, Invitrogen) e com um controle negativo de extração (amostra proveniente do fluido de células VERO não infectadas) durante 30 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 80V e 7mA, respectivamente. Para verificar possíveis contaminações durante a realização da técnica de RT-PCR, amostras contendo apenas água livre de ARNase e os respectivos componentes da mistura de RT-PCR foram também migrados no gel.

2.2.6 Purificação do cADN

A purificação do cADN foi realizada utilizando *kit* comercial GFX™ *PCR DNA and Gel Band purification* (Amersham Biosciences) no qual colunas de retenção a base de sílica foram usadas. O procedimento foi realizado como segue: i) retirou-se com auxílio de estilete metálico as bandas visualizadas no gel, sendo as mesmas transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis previamente pesados; ii) O peso das bandas foram calculados mediante a subtração do peso total do tubo (peso do tubo + peso do fragmento) pelo peso do tubo sem o gel; iii) Adicionou-se 1 volume de tampão de captura em relação ao peso da banda (ex: 1mg de gel para cada 1 µL de tampão de captura); iv) Os tubos foram misturados vigorosamente e incubados a 60°C durante 5 minutos ou até que a agarose fosse completamente dissolvida; v) Após a completa dissolução da agarose, as amostras foram transferidas para um tubo coletor contendo a coluna de retenção GFX, em seguida incubado por 1 minuto e centrifugado por 30 segundos; vi) O filtrado foi completamente descartado, sendo repetido o passo anterior se necessário; vii) Adicionaram-se 500 µL de tampão de lavagem aos tubos sendo estes em seguida centrifugados a 14.000 rpm por 30 segundos; e viii) As colunas foram transferidas do interior do tubo coletor para um tubo de 1,5 mL estéril, sendo posteriormente adicionados a cada uma das colunas o volume de 50 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; TE pH 8,0) ou água livre de ARNase e ADNase. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto para recuperar o ADN retido na coluna.

2.2.7 Clonagem do cADN

A clonagem dos cADN purificados, referentes aos segmentos genômicos P e M dos vírus do grupo C, foi realizada em sistema plasmidial-bacteriano cujo vetor de clonagem contendo o cADN viral foi propagado em bactérias competentes, obedecendo as seguintes etapas: i) ligação: inserção do cADN viral no plasmídio (vetor); ii) transformação bacteriana: multiplicação das bactérias contendo o ADN plasmidial recombinante; iii) seleção de clones recombinantes; e iv) Isolamento do ADN plasmidial recombinante. A clonagem foi realizada com o kit comercial *PGEM T® -Easy vector System II* (Invitrogen) que utiliza o plasmídio *PGEM-T easy* e a linhagem JM 109 da bactéria *Escherichia coli* como vetor de clonagem e células competentes bacterianas, respectivamente.

2.2.7.1 Vetor de clonagem

Os vetores de clonagem são moléculas de ADN com propriedades autoduplicativas capazes carregar outros fragmentos de ADN, sendo que os mais utilizados são os plasmídios de *Escherichia coli* e moléculas derivadas dos bacteriófagos I e M13. As características básicas de um vetor são: i) poder ser introduzido numa célula hospedeira; ii) conter uma origem de replicação, o que permite sua duplicação no hospedeiro; iii) células contendo o vetor podem ser facilmente selecionadas pelo fenótipo conferido ao hospedeiro, por um gene presente no vetor como, por exemplo, resistência a antibióticos e ausência de coloração na colônia bacteriana.

2.2.7.2 Ligação

O processo de ligação consiste na inserção de uma molécula de ADN a ser clonada em determinada região do ADN plasmidial, tendo como objetivo originar um ADN recombinante. No caso do vetor plasmidial *PGEM T®-Easy*, o cADN viral será inserido ao nível do gene plasmidial *lac-Z* a-peptídeo (Figura 9) que confere à bactéria capacidade de expressar fenotipicamente a coloração azul em meios de culturas. Os cADNs obtidos para os vírus do grupo C foram ligados ao ADN plasmidial conforme descrito a seguir. Os tubos contendo o vetor plasmidial e o controle de inserção, foram brevemente centrifugados durante 30 segundos a 12.000 rpm. Em seguida, preparou-se a mistura de ligação conforme descrito no Tabela 5. Posteriormente, as reações foram misturadas mediante pipetagem e incubadas durante 1 hora a TA. Alternativamente, as reações foram submetidas a incubação durante a noite a temperatura de 4°C para obtenção do número máximo de transformantes. A concentração do cADN inserido no vetor foi calculada empregando-se a equação matemática abaixo:

$$\text{ng do inserto} = \left[\frac{\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho do cADN (Kb)}}{\text{Tamanho do vetor em Kb}} \right] \times \text{razão molar vetor : cADN}$$

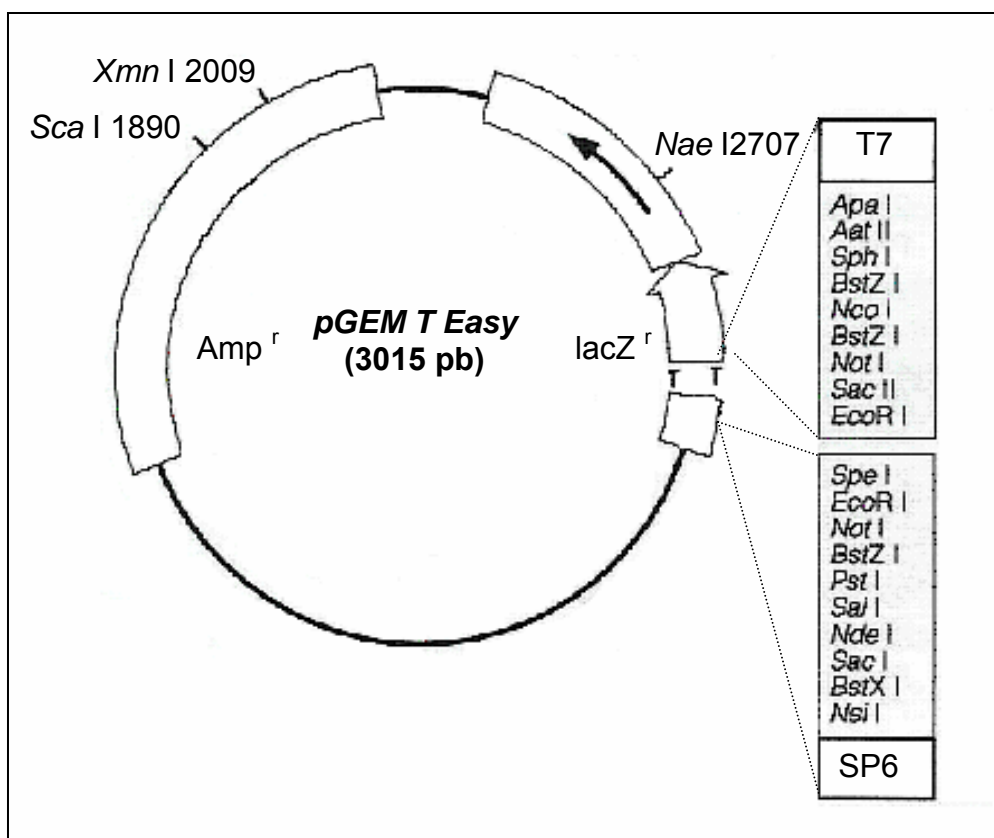


Figura 9 - Mapa circular do vetor plasmidial *PGEM-T Easy* (Invitrogen) utilizado para clonagem dos cADNs obtidos para os vírus do grupo C. Observar. Fonte: *Promega Technical Manual Part# TM042*

Tabela 5 - Reação de ligação.

| Reagentes | Reação padrão | Controle positivo | Controle negativo |
|------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2 x tampão de ligação | 5 µL | 5 µL | 5 µL |
| Vetor (50 ng) | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| cADN viral | X | - | - |
| ADN controle | - | 2 µL | - |
| T4 ADN ligase (3u/ µL) | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| Água deionizada* | 10 µL | 10 µL | 10 µL |

* água deionizada para volume final de 10 µL

2.2.7.3 Transformação

A transformação bacteriana consiste em uma metodologia relativamente simples e rápida, cujo fundamento baseia-se na introdução de um plasmídeo transformante (plasmídeo contendo ADN recombinante) através dos poros das membranas bacterianas após aplicação de choque térmico (Hyde & Hyde, 1984; Rifkin, 1998). O objetivo da transformação é produzir colônias bacterianas mutantes contendo em seu interior o ADN plasmidial recombinante. Para a realização da transformação bacteriana, placas de petri contendo meio LB sólido, IPTG e X-Gal (apêndice) foram previamente preparadas. Em seguida, as reações de ligação foram centrifugadas durante 10 segundos a 12.000 rpm, sendo em seguida, todo o volume da ligação (10µL) adicionado a 50 µL de células competentes JM 109. As células competentes foram incubadas em gelo durante 20 minutos e, após esse período, submetidas

a um choque térmico a 42°C durante 50 segundos, sendo os tubos retornados imediatamente ao gelo e incubados por 2 minutos adicionais. O volume de 900 µL de meio SOC (apêndice) foi adicionado aos tubos contendo as reações de transformação, sendo os mesmos posteriormente incubados em agitador térmico automático por 1 hora e 30 minutos a 37°C ajustando a rotação para 150 rpm.

2.2.7.4 – Seleção e multiplicação de clones mutantes

A seleção de clones mutantes é considerada uma etapa crítica para o sucesso da clonagem, onde colônias que apresentam o ADN plasmidial recombinante inseridos devem ser corretamente selecionadas. O cADN viral inserido ao nível do gene plasmidial lac-Z a-peptídeo inativa a expressão fenotípica normal das bactérias (cor azul), sendo portanto as bactérias mutantes identificadas pela coloração branca. Os clones mutantes foram selecionados como descrito a seguir: i) Adicionaram-se 250 µL de cada reação de transformação às placas de petri previamente preparadas e levadas a TA; ii) As reações foram espalhadas homoganeamente por toda a superfície das placas e incubadas, emborcadas, a 37°C durante a noite; iii) As placas foram retiradas da estufa e incubadas a 4 °C por 2 horas para definição da cor das colônias (brancas ou azuis); iv) Três colônias brancas (mutantes) foram selecionadas cuidadosamente; v) As colônias de bacterias mutantes previamente selecionadas foram adicionadas ao interior de tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido e 5 µL ampicilina (100 mg/mL); vi) As colonias selecionadas foram incubadas em agitador térmico automático a 37 °C

durante 9 horas em rotação de 170 rpm objetivando a propagação das bactérias mutantes; vii) Após o período de propagação das colônias bacterianas mutantes, as mesmas foram submetidas ao isolamento do ADN recombinante plasmidial utilizando o *kit* comercial *GFX plasmid miniprep kit* (Amersham Biosciences) conforme descrito pelo fabricante.

2.2.8 Análise do produto da RT-PCR Clonado

Os produtos da RT-PCR clonados foram analisados pelo uso de enzimas de restrição capazes de clivar o ADN plasmidial em sítios específicos. O vetor *PGEM T- Easy* apresenta sítio de digestão para várias enzimas de restrição localizados próximos ao sítio de inserção do cADN clonado, dentre os quais a enzima *ECO-R1* é capaz de clivar o ADN do plasmídio em regiões correspondentes aos nucleotídeos 52 e 70, região esta que flanqueia o inserto (Figura 10). A digestão do ADN plasmidial foi realizada pela adição de 8 μL de ADN a 2 μL da mistura de digestão composta por 1 μL do tampão de reação 10X e 1 μL da enzima *ECO R-I* (12U/ μL , Invitrogen). As amostras foram posteriormente incubadas durante 1 hora em banho Maria a 37°C, em seguida migradas em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos a 90V e 20mA. As amostras digeridas com a enzima *ECO R-I* foram visualizadas em transiluminador com UV para verificar a eficácia da clonagem. O ADN plasmidial pode ser diferenciado do cADN clonado segundo suas propriedades migracionais. Neste caso, o ADN do plasmídio (3Kb) foi visualizado acima do cADN clonado (aproximadamente 0,9 Kb) por migrar mais lentamente ao longo da malha do gel.

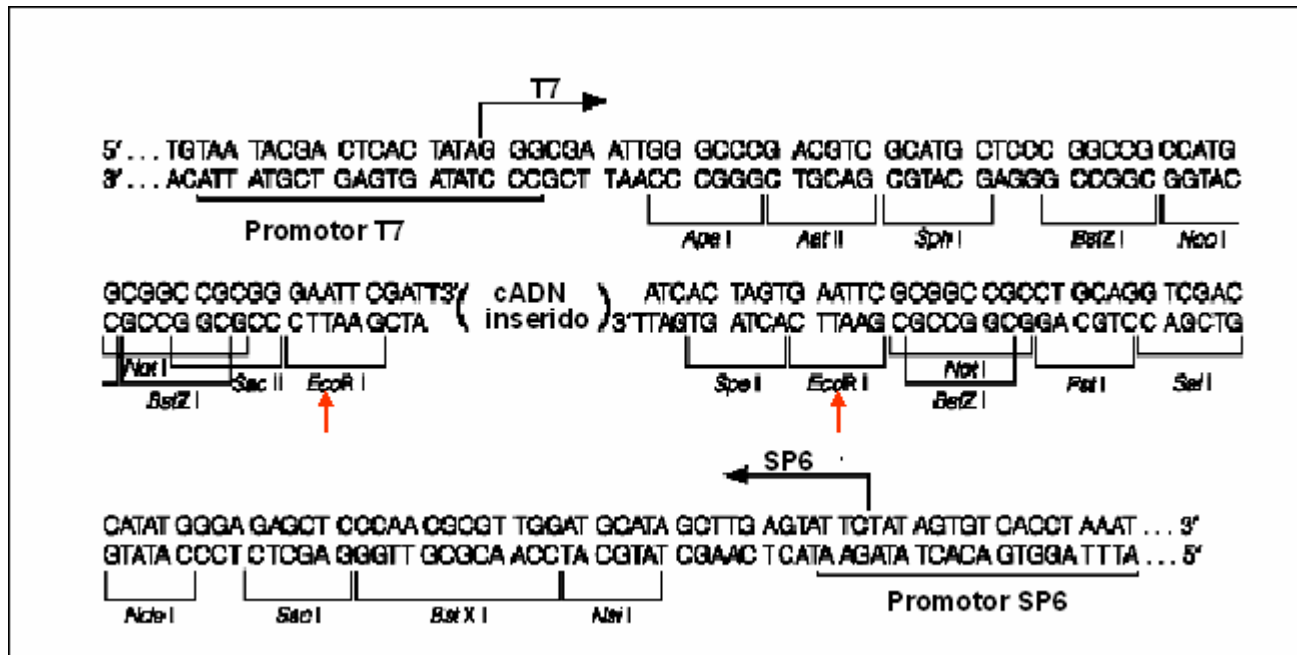


Figura 10 – Sítios de clivagem do cADN inserido. A clivagem pela enzima de restrição ECO RI é realizada ao nível dos nucleotídeos 52 e 70 da seqüência do ADN plasmidial (setas em vermelho). Fonte: *Promega Technical Manual Part# TM042*.

2.2.9 Seqüenciamento

O seqüenciamento dos cADNs previamente clonados e purificados foi realizado utilizando o kit ABI PRISM Dye Terminator (Applied Biosystems), cujas reações foram processadas em um seqüenciador automático, modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystem), pelo emprego do método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes, que ao contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos quatro nucleotídeos que compõem basicamente a molécula de ADN (A, C, T, G) localizados na extremidade 3' (Sanger *et al.*, 1977). O seqüenciamento das amostras pelo método automático apresentou as seguintes etapas: i) Reação de seqüenciamento composta pela mistura de 2 µL (80 ng) de ADN plasmidial, 8 µL de tampão de reação contendo a os dideoxinucleotídeos fluorescentes ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP (*Terminator reaction mix*), 3,5 pmoles dos iniciadores T7 ou SP6 e água para o volume final de 20 µL, tendo as mesmas, sido processadas em termociclador automático (GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems) programado para realizar 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização dos iniciadores (T7 e SP6) a 50 °C por 5 segundos e síntese a 60 °C por 4 minutos; ii) Precipitação do ADN pela adição de 2µL de NaCH₃COO 3M pH 5,0 e 50µL de etanol a 96% ao volume total da reação de seqüenciamento. Em seguida as amostras foram submetidas a etapas seqüenciais de: 1) incubação em gelo por 10 minutos; 2) precipitação por centrifugação durante 15 minutos a 14.000 rpm a 8 °C; 3) lavagem com 250 µL

de etanol a 70%; 4) centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 8 °C seguida de incubação a TA para completa evaporação do etanol; e 5) reconstituição do ADN em 3 µL de solução de formamida e EDTA 25mM pH 8,0 na proporção 5:1, respectivamente; iii) Eletroforese no seqüenciador automático durante aproximadamente 7 horas, quando então os fragmentos de ADN marcados foram separados de acordo com seus tamanhos (diferença de 1 nucleotídeo entre cada fragmento), detectados por emissão de fluorescência em diferentes comprimentos de onda, e interpretados pelo sistema computacional do equipamento segundo códigos de cores (azul, vermelho, verde e amarelo) ao passarem pela região de leitura ótica do sequenciador.

2.3 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS E FILOGENIA

As seqüências nucleotídicas obtidas para os segmentos P-ARN e M-ARN referentes aos vírus do grupo C foram inicialmente comparadas entre si e com seqüências de outros ortobunyavírus pertencentes aos sorogrupos Bunyamwera, Califórnia e Simbu disponíveis no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando os programas Clustal V (Higgins, 1994; Altschul & Gish, 1996), SeqMan star 5.03 © (DNA star inc.) e Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2000). As árvores filogenéticas foram construídas usando os métodos de *neighbor joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987); máxima parsimônia (MP) (Swofford, 1999), e máxima verossimilhança (MV) (Goldman *et al.*, 2000), implementados nos programas computacionais PAUP 4.0 (Swofford, 1999) e Mega 2.1 (Kumar, 2000). Para a análise pelo método de NJ, a matriz de distância foi calculada a partir das seqüências alinhadas usando a fórmula de dois parâmetros de

Kimura (Kimura, 1980). Em relação à análise pelo método de MP, os valores de 4:1 foram adotados para avaliação da razão transição/ transversão. A análise de *bootstrap* usando 1000 réplicas foi utilizada para gerar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos (Felsenstein, 1985). O enraizamento da árvore filogenética foi feito utilizando seqüências de outros ortobunyavírus pertencentes aos grupos Simbu, California e Bunyamwera, que funcionaram como grupos externos proporcionando uma análise mais fidedigna do relacionamento genético dos vírus do grupo C. O método de MV foi aplicado utilizando o teste de Kishino-Hasegawa (Goldman *et al.*,2000). Modelos evolutivos foram otimizados para ambos os grupos de segmentos genômicos mediante o estabelecimento de uma topologia competitiva entre os mesmos, objetivando a análise do grau de confiabilidade das topologias geradas para cada segmento de ARN.

3 RESULTADOS

3.1 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA RT-PCR PARA OS SEGMENTOS P-ARN E M-ARN.

Os treze vírus do grupo C tiveram seus P-ARN amplificados utilizando os pares de iniciadores BUN-F e BUN-R, enquanto que sete protótipos virais (VORI, VCAR, VAPEU, VMUR, VITQ, VMTB e VRES) tiveram parcialmente amplificados seus segmentos M-ARN ao nível do gene Gn. A análise eletroforética em gel de agarose evidenciou fragmentos entre 900 pb e 1000 pb para o segmento P-ARN, enquanto que para os fragmentos referentes ao segmento M-ARN, mostraram tamanho entre 300 pb e 400 pb (Figura 11)

3.2 CLONAGEM

Os segmentos P-ARN dos 13 vírus do grupo C e os fragmentos referentes às seqüências nucleotídicas parciais do gene Gn do segmento M-ARN de sete membros deste grupo viral foram clonados. Noventa plasmídios contendo os cADNs clonados foram obtidos e digeridos com a enzima Eco R I, para verificação da eficácia da clonagem. Cerca de 98% dos cADN clonados revelaram, após digestão, tamanhos compatíveis aos fragmentos amplificados pela RT-PCR (Figura 12). Dois por cento dos plasmídios evidenciaram inserção de fragmentos não compatíveis ao tamanho esperado, sendo estes excluídos do seqüenciamento.

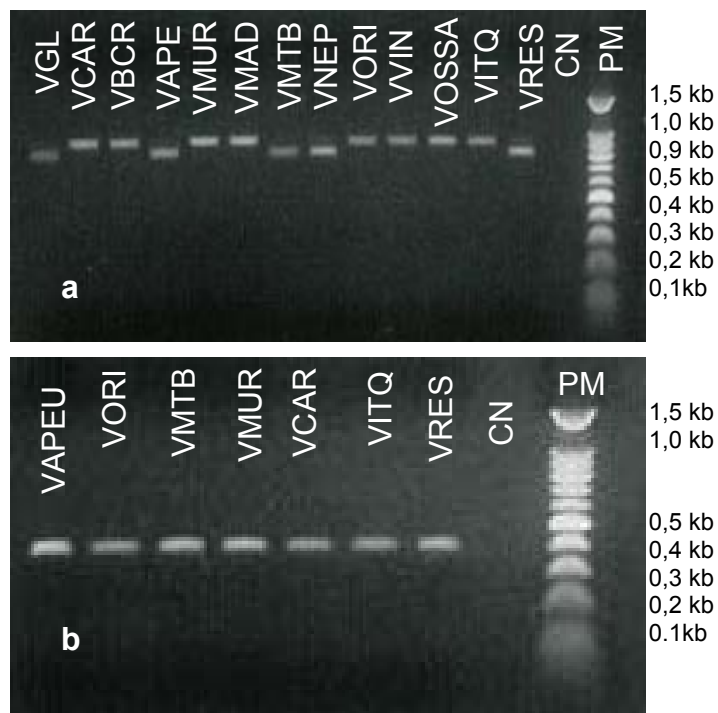


Figura 11 – Visualização dos produtos de RT-PCR (cADN) para os segmentos P-ARN (a) e M-ARN (b) em gel de agarose a 1,2% para os vírus do grupo C. CN: controle negativo (amostra de fluido de células VERO não infectadas); PM: marcador de peso molecular 100bp-1,5kb (Promega)

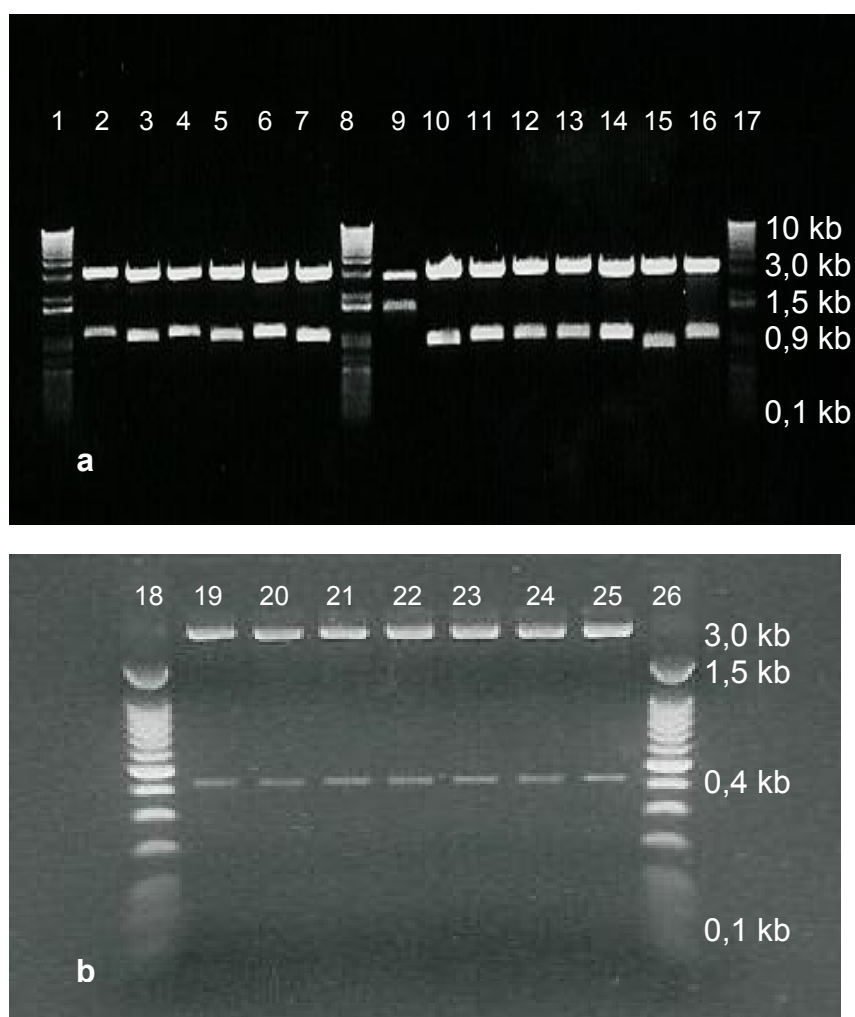


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 1,2% evidenciando os produtos de clonagem para os segmentos P-ARN (a) e M-ARN, gene Gn (b). Bandas com 3kb: ADN plasmidial. Orifícios 1, 8, 17: peso molecular 0,1 – 10kb (Promega); 9: ADN plasmidial com inserção não bem sucedida (ADN inserido de tamanho não esperado para o segmento P-ARN); 18 e 26: peso molecular 0,1-1,5 kb (Promega); 2: V VIN; 3 e 19: VITQ; 4 e 20: VMUR; 5: VNEP; 6 e 21: VRES; 7 e 22: VMTB; 10 e 23: VAPEU; 11 e 24: VORI; 12: VOSSA; 13 e 25: VCAR; 14: VBRC; 15: VGL; 16: VMAD.

3.3 O SEGMENTO P-ARN DOS VÍRUS DO GRUPO C.

A partir dos clones selecionados, os segmentos P-ARN dos 13 vírus protótipos do grupo C e da cepa viral BeH 5546 foram seqüenciados (Figura 13), bem como o gene N de 18 amostras referentes aos VORI, VMUR, VITQ, VCAR e VNEP foram completamente seqüenciados, evidenciando organização genômica similar aos demais ortobunyavírus. Os tamanhos obtidos para os segmentos P, apresentaram-se ligeiramente distintos quando comparados entre si, variando de 915 a 926 nt, compreendendo duas cadeias abertas para leituras (CAL) de tamanhos diferentes, flanqueadas por extremidades não codificantes 5' e 3' cujos comprimentos variaram de 73 nt a 76 nt e de 134 nt a 147 nt, respectivamente.

A CAL de tamanho maior evidenciou tamanho único de 705 nt para todos os protótipos virais do grupo C, enquanto que a CAL menor apresentou tamanho de 297 nt para a maioria dos vírus do grupo C, excetuando-se os VGL, VRES e VMAD com tamanho de 276 nt. A transcrição das CALs sugeriu que as mesmas codificam duas proteínas de tamanhos diferentes, sendo a maior composta por 237 aa, e a menor composta por 98 aa. No caso dos VGL, VRES e VMAD, essas proteínas apresentaram-se menores, constituídas por 91aa. O conteúdo A - U para o segmento P -ARN dos membros do grupo C revelou percentuais entre 54,0 % a 57,5% (Tabela 6).

A análise computacional das CALs observadas para os vírus do grupo C ao longo do segmento P-ARN utilizando o programa *BLAST-search* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), evidenciou homologia com duas proteínas codificadas pelo segmento P-ARN dos ortobunyavírus, uma proteína estrutural

de nucleocapsídeo (N) e outra proteína não estrutural denominada NSs.

(a) VAPEU - cepa Be An848

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|-------------|----------|
| 1 | AGTAGTGTGC | TCCACTCGAA | TAATTTGAAA | GTTACATTGC | AAGAGTGTTT | |
| 51 | CTTAGTTAGC | CATAGTTTTA | ACGTTTCATGA | TCGAACTAGT | GTTCAAAGAT | |
| | | | M I | E L V | F K D | Gene N |
| | | | | | M | Gene NSs |
| 101 | GTCGCCTCTT | TCACAGACAA | TACATTTGAT | CCAGAAGCTG | CTTATGTCAG | |
| | V A S F | T D N | T F D | P E A A | Y V R | Gene N |
| | S P L | S Q T I | H L I | Q K L | L M S D | Gene NSs |
| 151 | ATTTAAGCCT | GCCTATGGCT | CAGAATTGGA | GTCATCTATT | GTTTCGAGTCT | |
| | F K P | A Y G S | E L E | S S I | V R V F | Gene N |
| | L S L | P M A | Q N W S | H L L | F E S | Gene NSs |
| 201 | TCTACATCAA | TGCAGCGAAG | GTCAAAGCTT | ACCTTCGGAG | GTCATCAGAG | |
| | Y I N | A A K | V K A Y | L R R | S S E | Gene N |
| | S T S M | Q R R | S K L | T F G G | H Q S | Gene NSs |
| 251 | CTTTTGGTTT | TACTTACACT | TGGAGGAGTT | AACCTTGCTG | TTCTTAATAC | |
| | L L V L | L T L | G G V | N L A V | L N T | Gene N |
| | F W F | Y L H L | E E L | T L L | F L I R | Gene NSs |
| 301 | GCATTTTCCT | GGAACCCAGT | CCATTCCACT | GCCTGACTAC | GGACTTACCA | |
| | H F P | G T Q S | I P L | P D Y | G L T I | Gene N |
| | I F L | E P S | P F H C | L T T | D L P | Gene NSs |
| 351 | TACATAGGTT | GTCCGGTTAC | CTCGCTAGAT | GGGCTCTTTA | CCTGATTTAC | |
| | H R L | S G Y | L A R W | A L Y | L I Y | Gene N |
| | Y I G C | P V T | S L D | G L F T | | Gene NSs |
| 401 | ATAATCCCTG | AGTCAGATAT | TGACCTGGTC | AGGACAACCT | TCATCGTTCC | |
| | I I P E | S D I | D L V | R T T F | I V P | Gene N |
| 451 | ACTCGCCGAG | GAGAATGGCA | TCACTTGGAC | TGATGGAGTT | GCAATGTATC | |
| | L A E | E N G I | T W T | D G V | A M Y L | Gene N |
| 501 | TGGCTTTCTT | ACCAGGTGCT | GAAATGTTTA | TGTCAACTTT | CAAGTTCTTC | |
| | A F L | P G A | E M F M | S T F | K F F | Gene N |
| 551 | CCATTGACTA | TAGGAATGTA | CAGGGTTTCG | AGGTGGAGCA | TGGACCCTAA | |
| | P L T I | G M Y | R V R | R W S M | D P N | Gene N |
| 601 | CTGTCTTGAG | AAAGCGATAT | GGCAGAGGTA | TATGGGAATA | GGTGCAGATG | |
| | C L E | K A I W | Q R Y | M G I | G A D D | Gene N |
| 651 | ATTGGATCAC | GAAAGAAACA | GTTACTATCC | TAGCTCGGTT | CGAAGATGTT | |
| | W I T | K E T | V T I L | A R F | E D V | Gene N |
| 701 | GAGAAGCTAG | ACTGGGCTAG | AACTGCTTTC | ACCAGTTCAG | CCAGAGAATT | |
| | E K L D | W A R | T A F | T S S A | R E F | Gene N |
| 751 | CGTGAGTCAA | TTTGGTATTA | AGTTAGCATA | AATTCTTATA | ATTGCCATTC | |
| | V S Q | F G I K | L A * | | | Gene N |
| 801 | TCAAGTTTCA | TTATGAAGCA | ACATAAGACA | ACAGCTAAAT | GGGTGGGTGG | |
| 851 | TCGGGGACAC | GAATAAATCA | GGTGTCCAGAT | CATGAATTTT | ATTTAGAATT | |
| 901 | GGTGGAGCAC | ACTACT | | | | |

Figura 13 – Seqüências nucleotídicas do segmento P-ARN dos 13 vírus protótipos pertencentes ao grupo C e da amostra BeH 5546. Letras em caixa alta representam as seqüências aminoacídicas para os genes N e NSs. Os codons de iniciação e terminalização estão representados por metioninas (M) e estrelas, respectivamente.

continua.

(f) VCAR – cepa BeAn 3994

```

1 AGTAGTGTGC TCCACTCGAA TAATTTGAGG G TACTTTTAA CGAAGTTATA
51 TCACACCCAA CCCTTCATTT GACGTGATGA TAGAACTAAT ATTTAAAGAT
      M I E L I F K D      Gene N
      M                      Gene NSs
101 GTGGCCTCAT TCACAGACAA TACATTTGAC CCTGAAGCTG CTTTCCTTAG
      V A S F T D N T F D P E A A F L R      Gene N
      W P H S Q T I H L T L K L L S L D      Gene NSs
151 ATTCGAAAGT GCATACGGCA GCCAATTGGT TTCTGCCGTC GTACGAGTCT
      F E S A Y G S Q L V S A V V R V F      Gene N
      S K V H T A A N W F L P S Y E S      Gene NSs
201 TCTACATCAA CGCGGCGAAG GTCAAAGCTT ACCTCAGTAG GTCAAGCGAA
      Y I N A A K V K A Y L S R S S E      Gene N
      S T S T R R R S K L T S V G Q A N      Gene NSs
251 CTCCTTGTTT TTCTTACTCT TGGTGGAGTT AACCTTGCCG TACTTAACAC
      L L V F L T L G G V N L A V L N T      Gene N
      S L F F L L L V E L T L P Y L T R      Gene NSs
301 GCATTTCCCA GGAACCCAGT CCATTCCACT GCCTGACTAC GGACTCACGT
      H F P G T Q S I P L P D Y G L T L      Gene N
      I S Q E P S P F H C L T T D S R      Gene NSs
351 TGCATCGCAT ATCAGGTTAC TTGGCCAGAT GGGCGTTGTA TCTAATTAGA
      H R I S G Y L A R W A L Y L I R      Gene N
      C I A Y Q V T W P D G R C I * L E      Gene NSs
401 ACAAACCCTG AATCCGACAT TGCGCTGGTA CGCTCAACTT TTGTAGTACC
      T N P E S D I A L V R S T F V V P      Gene N
      Q T L N P T L R W Y A Q L L *      Gene NSs
451 GCTAGCCGAA GAAAACGGTA TTACATGGCG TGACGGAGTG GAGATGTACC
      L A E E N G I T W R D G V E M Y L      Gene N
501 TAGCCTTTTT GCCAGGGGCT GAGATGTTCA TGTCGACTTT TGAATTCTAC
      A F L P G A E M F M S T F E F Y      Gene N
551 CCTTTAACGA TTGGCATGTA TAGGGTGCGA CGATGGTCTA TGGACCCGAA
      P L T I G M Y R V R R W S M D P N      Gene N
601 CTGCCTGGAG AAGGCAATTT GGCAACGTTA CATGGGTATA GGTGCTGACC
      C L E K A I W Q R Y M G I G A D Q      Gene N
651 AGTGGATAAC GAAGGAGACG GTCGCAATCC TGACACGTTT TGAGGATGTC
      W I T K E T V A I L T R F E D V      Gene N
701 GAAAAACTAG ATTGGGCCAG GACAGCGTTC ACGAGTGCTG CTAGAGAATT
      E K L D W A R T A F T S A A R E F      Gene N
751 CGTGAGCCGA TTTGGTATCC GTTTAGCGTA ATCAATAATC ACGATTGCAA
      V S R F G I R L A *      Gene N
801 TTCTTAGAGC CTCGAAAAG GACAATATAA GACACCAGCA AAATGGGTGG
851 GTGGTCGGGG ACACCAAGAT TATTACGTTG TGAGTTCATT AATCAAATTT
901 AGAATTGGTG GAGCACACTA CT

```

continua.

(h)VBRC – cepa 77V-74814

| | | | | | | |
|-----|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------|------------|----------|
| 1 | AGTAGTGTGC | TCCACTCGAA | TAATTTGAGA | GTACTIONTTAA | CAAAGTTATA | |
| 51 | TCACACCCAA | CCCTTCATTT | GACGTGATGA | TAGAACTAAT | ATTTAAAGAT | |
| | | | M I E L I F K D | | | Gene N |
| | | | | | M | Gene NSs |
| 101 | GTCGCCTCAT | TCACAGACAA | TACATTTGAC | CCTGAAGCTG | CTTTCCTTAG | |
| | V A S F T D N T F D P E A A F L R | | | | | Gene N |
| | S P H S Q T I H L T L K L L S L D | | | | | Gene NSs |
| 151 | ATTCGAAAGT | GCATACGGCA | GCCAATTGGT | GTCTGCCGTC | GTACGAGTCT | |
| | F E S A Y G S Q L V S A V V R V F | | | | | Gene N |
| | S K V H T A A N W C L P S Y E S | | | | | Gene NSs |
| 201 | TCTACATCAA | CGCGGCGAAG | GTCAAAGCTT | ACCTCAGTAG | GTCAAGCGAA | |
| | Y I N A A K V K A Y L S R S S E | | | | | Gene N |
| | S T S T R R R S K L T S V G Q A N | | | | | Gene NSs |
| 251 | CTCCTTGTTT | TTCTTACTCT | TGGTGGAGTT | AACCTTGCCG | TACTTAACAC | |
| | L L V F L T L G G V N L A V L N T | | | | | Gene N |
| | S L F F L L L V E L T L P Y L T R | | | | | Gene NSs |
| 301 | GCATTTCCCA | GGAACCCAGT | CCATTCCACT | GCCTGACTAC | GGACTCACGT | |
| | H F P G T Q S I P L P D Y G L T L | | | | | Gene N |
| | I S Q E P S P F H C L T T D S R | | | | | Gene NSs |
| 351 | TGCATCGCAT | ATCGGGTTAC | TTGGCCAGAT | GGGCCTTGTA | TCTAATTAGA | |
| | H R I S G Y L A R W A L Y L I R | | | | | Gene N |
| | C I A Y R V T W P D G P C I * L E | | | | | Gene NSs |
| 401 | ACAAACCCTG | AATCCGACAT | TGCGCTGGTA | CGCTCAACTT | TTGTAGTACC | |
| | T N P E S D I A L V R S T F V V P | | | | | Gene N |
| | Q T L N P T L R W Y A Q L L * | | | | | Gene NSs |
| 451 | GCTAGCCGAA | GAAAACGGTA | TTACATGGCG | TGACGGAGTG | GAGATGTACC | |
| | L A E E N G I T W R D G V E M Y L | | | | | Gene N |
| 501 | TAGCCTTTTT | GCCAGGGGCT | GAGATGTTCA | TGTCGACTTT | TGAATTCTAC | |
| | A F L P G A E M F M S T F E F Y | | | | | Gene N |
| 551 | CCTTTAACGA | TTGGGATGTA | TAGGGTGCGA | CGATGGTCTA | TGGACCCGAA | |
| | P L T I G M Y R V R R W S M D P N | | | | | Gene N |
| 601 | CTGCCTGGAG | AAGGCAATTT | GGCAACGTTA | CATGGGTATA | GGTGCTGACC | |
| | C L E K A I W Q R Y M G I G A D Q | | | | | Gene N |
| 651 | AGTGGATAAC | GAAGGAGACG | GTCGCAATCC | TGACACGTTT | TGAGGATGTC | |
| | W I T K E T V A I L T R F E D V | | | | | Gene N |
| 701 | GAAAACTAG | ATTGGGCCAG | GACAGCGTTC | ACGAGTGCTG | CTAGAGAATT | |
| | E K L D W A R T A F T S A A R E F | | | | | Gene N |
| 751 | CGTGAGCCGA | TTTGGTATCC | GTTTAGCGTA | ATCAATAATC | ACGATTGCAA | |
| | V S R F G I R L A * | | | | | Gene N |
| 801 | TCCTTAGAGC | CTCGCAGAAG | GACAATATAA | GACACCAGCA | AAATGGGTGG | |
| 851 | GTGGTCGGGG | ACACCAAGAT | TATTACGTTG | TGAGTTCATT | AATCCAATTT | |
| 901 | AGAATTGGTG | GAGCACACTA | CT | | | |

continua.

(i) VNEP – cepa TRVL 18462

```

1 AGTAGTGTGC TCCACTCGAA TAATTTGAAA GTTCTATTAG AACAGCTCAT
51 TCTTACCCAA CCATTCAATT AACCGATGAT CGAACTAGTG TTTAAAGATG
      M I E L V F K D E Gene N
      M Gene NSs
101 AGGCCTCTTT CACAGACAAT ACATTTGATC CAGAAGCTGC TTATGTCAGA
      A S F T D N T F D P E A A Y V R Gene N
      R P L S Q T I H L I Q K L L M S D Gene NSs
151 TTTAAGCCTG CCTACGGCTC CGAATTGGAG TCGGCTATTG TTCGAGTCTT
      F K P A Y G S E L E S A I V R V F Gene N
      L S L P T A P N W S R L L F E S S Gene NSs
201 CTACATCAAT GCAGCGAAGG TCAAAGCTTA CCTACGAAGG TCATCTGAGC
      Y I N A A K V K A Y L R R S S E L Gene N
      T S M Q R R S K L T Y E G H L S Gene NSs
251 TTTTGGTTTC ACTTACACTT GGAGGCGTTA ACCTTGCTGT TCTTAATACC
      L V S L T L G G V N L A V L N T Gene N
      F W F H L H L E A L T L L F L I P Gene NSs
301 CATTTCCTG GAACCCAGTC CATTCCACTG CCTGACTACG GACTTACCAT
      H F P G T Q S I P L P D Y G L T I Gene N
      I F L E P S P F H C L T T D L P Y Gene NSs
351 ACACCGGTTG TCAGGTTACC TGGCCAGATG GGCACHTTAC CTGATTTGCC
      H R L S G Y L A R W A L Y L I C P Gene N
      T G C Q V T W P D G H F T * Gene NSs
401 CAATCCAGA TTCTGATATA GATCTCGTGA GGACTACTTT CATCGTTCCA
      I P D S D I D L V R T T F I V P Gene N
451 CTCGCCGAAG AGAATGGGAT CACTTGGACT GATGGTGTTG CAATGTACCT
      L A E E N G I T W T D G V A M Y L Gene N
501 GGCCTTCTTG CCAGGAGCCG AGATGTTTCAT GTCAACTTTT ACGTTCTTCC
      A F L P G A E M F M S T F T F F P Gene N
551 CGCTGACTAT CGGTATGTAC AGGGTTCGGA GGTGGAGCAT GGACCCTAAT
      L T I G M Y R V R R W S M D P N Gene N
601 TGTCTAGAGA AAGCCATCTG GCAAAGATAT ATGGGCATTG GAGCTGATGA
      C L E K A I W Q R Y M G I G A D D Gene N
651 CTGGATTACT AAAGAAACAG TTACTATCCT AGCGCGGTTT GAGGATGTCTG
      W I T K E T V T I L A R F E D V E Gene N
701 AGAAGCTCGA CTGGGCTAGA ACTGCATTTA CCAGTTCAGC CAGAGAGTTC
      K L D W A R T A F T S S A R E F Gene N
751 GTGAGTCAAT TTGGTATCAA ATTAGCGTAA CAATTCTCAT AATTGCGATT
      V S Q F G I K L A * Gene N
801 TTCAGAGTTC AGCATTAAAGC AACATAAGCC AACAGCAAAA TGGGTGGGTG
851 GTCGGGGACA CCAATAAAGC AGGTAGCAAA TTCATAAATC TTATTTAGAA
901 TTGGTGGAGC ACACTACT

```

continua.

(j) VOSSA – cepa BT 1820

| | | | | | | |
|-----|-------------|------------|-------------|--------------|------------|----------|
| 1 | AGTAGTGTGC | TCCACTCGAA | TAACCTTGAGA | GTACTIONTTGA | CGAAGTTCTA | |
| 51 | TGGACATCCT | ACCCTACATT | TAACCTATGA | TAGAACTAAT | ATTTAAAGAT | |
| | | | M I | E L I | F K D | Gene N |
| | | | | | M | Gene NSs |
| 101 | GTTGCGTCAT | TCACAGACAA | TACATTTGAC | CCTGAAGCTG | CTTTCCTTAG | |
| | V A S F | T D N | T F D | P E A A | F L R | Gene N |
| | L R H | S Q T I | H L T | L K L | L S L D | Gene NSs |
| 151 | ATTCGAAAGT | GCATACGGCA | GTCAATTGGT | ATCTGCCGTC | GTACGAGTCT | |
| | F E S | A Y G S | Q L V | S A V | V R V F | Gene N |
| | S K V | H T A | V N W Y | L P S | Y E S | Gene NSs |
| 201 | TCTACATCAA | CGCGGCGAAG | GTCAAAGCTT | ACCTCAGTAG | GTCAAGGGAA | |
| | Y I N | A A K | V K A Y | L S R | S R E | Gene N |
| | S T S T | R R R | S K L | T S V G | Q G N | Gene NSs |
| 251 | CTCCTTGTTT | TTCTTACTCT | TGGAGGGGTT | AACCTTGCCG | TACTTAACAC | |
| | L L V F | L T L | G G V | N L A V | L N T | Gene N |
| | S L F | F L L L | E G L | T L P | Y L T R | Gene NSs |
| 301 | GCATTTCCCA | GGAACCCAGT | CCATTCCACT | GCCTGACTAC | GGACTCACGT | |
| | H F P | G T Q S | I P L | P D Y | G L T L | Gene N |
| | I S Q | E P S | P F H C | L T T | D S R | Gene NSs |
| 351 | TGCATCGCAT | ATCCGGTTAC | TTGGCGAGAT | GGGCTTTGTA | TCTAATTAGG | |
| | H R I | S G Y | L A R W | A L Y | L I R | Gene N |
| | C I A Y | P V T | W R D | G L C I | * | Gene NSs |
| 401 | ACAAACCCTG | AATCCGATAT | TGCGCTGGTA | CGCTCAACTT | TTGTAGTACC | |
| | T N P E | S D I | A L V | R S T F | V V P | Gene N |
| 451 | GCTAGCCGAA | GAAAACGGTA | TTACATGGCG | TGACGGAGTG | GAGATGTACC | |
| | L A E | E N G I | T W R | D G V | E M Y L | Gene N |
| 501 | TAGCATTITTT | GCCAGGGGCT | GAGATGTTCA | TGTCGACTTT | TGAATTCTAC | |
| | A F L | P G A | E M F M | S T F | E F Y | Gene N |
| 551 | CCTTTAACGA | TTGGTATGTA | TAGGGTGCGA | CGATGGTCTA | TGGACCCGAA | |
| | P L T I | G M Y | R V R | R W S M | D P N | Gene N |
| 601 | CTGCCTGGAG | AAGGCAATTT | GGCAACGTTA | CATGGGTATA | GGTGCTGACC | |
| | C L E | K A I W | Q R Y | M G I | G A D Q | Gene N |
| 651 | AGTGGATAAC | TAAGGAGACG | GTCGCAATCC | TGACACGTTT | TGAGGATGTC | |
| | W I T | K E T | V A I L | T R F | E D V | Gene N |
| 701 | GAAAACTAG | ATTGGGCCAG | GACAGCGTTC | ACGAGTGCTG | CTAGAGAATT | |
| | E K L D | W A R | T A F | T S A A | R E F | Gene N |
| 751 | CGTGAGCCGA | TTTGGTATCC | GTTTAGCGTA | ACAATACTCG | CGATTGCAAT | |
| | V S R | F G I R | L A * | | | Gene N |
| 801 | ATTAAGGGCC | TCTCAAGAGG | ACAATATAAG | ATACCAGCAA | AACGGGTGGG | |
| 851 | TGGTAGGGGA | TACTAAGATT | ATCACGTTGC | GAGTTCACTA | ATCTAACTTA | |
| 901 | GAATTGGTGG | AGCACACTAC | T | | | |

continua.

(k) VGL – cepa FE-3 71H

| | | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| 1 | AGTAGTGTGC | TCCA | CTCGAA | TAATTTGAAG | GTTCTTTTAT | CATAGCTTGT | |
| 51 | TCACACCTAG | CCCTACATTT | ATCCTGATGA | TCGAACTAGT | GTTCAAAGAT | | |
| | | | M I | E L V | F K D | | Gene N |
| | | | | | M | | Gene NSs |
| 101 | GAGACTTCTT | TCGCTGACAA | TACATTTAAT | CCGGAAGCTG | CTTTTGTGCG | | |
| | E T S F | A D N | T F N | P E A A | F V A | | Gene N |
| | R L L | S L T I | H L I | R K L | L L S H | | Gene NSs |
| 151 | ATTTAAGCCT | ACCCATGGAT | CGGAGTTGGA | GTCGTCTACT | GTTCGAATCT | | |
| | F K P | T H G S | E L E | S S T | V R I F | | Gene N |
| | L S L | P M D | R S W S | R L L | F E S | | Gene NSs |
| 201 | TCTACATCAA | TGCGGCGAAG | GTCAAAGCTT | ACCTGCGAAG | GTCAGCGGAG | | |
| | Y I N | A A K | V K A Y | L R R | S A E | | Gene N |
| | S T S M | R R R | S K L | T C E G | Q R S | | Gene NSs |
| 251 | CAACTGGTTT | CGCTTACTCT | TGGAGGAGTT | AACCTTGCTG | TGCTTAATAC | | |
| | Q L V S | L T L | G G V | N L A V | L N T | | Gene N |
| | N W F | R L L L | E E L | T L L | C L I P | | Gene NSs |
| 301 | CCATTTTCTC | GGAACCCAGT | CCATTCCACT | GCCTGACTAC | GGACTTACCA | | |
| | H F P | G T Q S | I P L | P D Y | G L T I | | Gene N |
| | I F L | E P S | P F H C | L T T | D L P | | Gene NSs |
| 351 | TCCACAGGTT | GTCCGGTTAC | CTAGCAAGAT | GGGCACTCTA | CCTAATTTGC | | |
| | H R L | S G Y | L A R W | A L Y | L I C | | Gene N |
| | S T G C | P V T | * | | | | Gene NSs |
| 401 | CCTAGCCCAG | ACTCGAGCAT | AGGTCTCGTA | CGGGCTACTT | TTGTCGTTCC | | |
| | P S P D | S S I | G L V | R A T F | V V P | | Gene N |
| 451 | GCTGGCCGAA | GAAAACGGAA | TAAGTTGGTG | TGATGGCGTA | GCGATGTACC | | |
| | L A E | E N G I | T W C | D G V | A M Y L | | Gene N |
| 501 | TGGCATTFTT | ACCTGGCGCC | GAAATGTTTA | TGTCAACTTT | TGCGTTCTTC | | |
| | A F L | P G A | E M F M | S T F | A F F | | Gene N |
| 551 | CCGCTCACAA | TCGGAATGTA | TAGAGTTCCG | AGGTGGACCA | TGGACCCTCA | | |
| | P L T I | G M Y | R V R | R W T M | D P Q | | Gene N |
| 601 | ATGTCTAGAA | AAGGCCATTT | GGCAACGATA | TATGGGTATT | GGTGCCGACG | | |
| | C L E | K A I W | Q R Y | M G I | G A D E | | Gene N |
| 651 | AATGGATAAC | TAAAGAGACA | GTATCTATCC | TTGCGCGTTT | CGAGGACGTT | | |
| | W I T | K E T | V S I L | A R F | E D V | | Gene N |
| 701 | GAAAAGCTCG | ATTGGGCTAA | GACTGCATTT | ACAAGTGCAG | CAAGAGAGTT | | |
| | E K L D | W A K | T A F | T S A A | R E F | | Gene N |
| 751 | TGTGAGTAAA | TTCGGAATCA | GGTTAGCGTA | AATTATATAA | TTGCGATACT | | |
| | V S K | F G I R | L A * | | | | Gene N |
| 801 | CAGAGCTCCG | CATAGAGCAA | CACAAAACCA | CAGCACAATG | GGTGGGTGGT | | |
| 851 | CGGGGACACC | AAGAAATTAG | ATGTAAGTTC | AGAGATAATA | TTAAGAATTG | | |
| 901 | GTGGAGCACA | CTACT | | | | | |

continua.

(I) VMAD – cepa BT 4075

| | | | | | | | |
|-----|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| 1 | AGTAGTGTGC | TCCA | CTCTAA | TCACTTGAAG | GTTACTCTGG | AAGAGGTTTG | |
| 51 | ATAGTTAGAC | TTACTTTTTGA | CGTGATGTCC | GA | ACTAGAGT | TTAAAGATGT | |
| | | | | | | | M C |
| | | | | | | | Gene NSs |
| | | | | | | | Gene N |
| 101 | GCCCTCATTT | GCAGACAATA | CATTTAACCC | GGAAGCTCAG | TATGTCACAT | | |
| | P H L | Q T I | H L T R | K L S | M S H | | Gene NSs |
| | P S F | A D N T | F N P | E A Q | Y V T F | | Gene N |
| 151 | TTATACCTAG | AAATGGAAGG | GTATTGGAGG | CTACTATTGT | TAGAATCTTC | | |
| | L Y L E | M E G | Y W R | L L L L | E S S | | Gene NSs |
| | I P R | N G R | V L E A | T I V | R I F | | Gene N |
| 201 | TACATCAATG | CGGCGAAGGT | CAAAGCTTAC | TTGCACAGGT | CGTCCGAGCA | | |
| | T S M | R R R S | K L T | C T G | R R S N | | Gene NSs |
| | Y I N A | A K V | K A Y | L H R S | S E Q | | Gene N |
| 251 | ACTTGTTCTC | CTTACTCTTG | GAGGGGTAA | CCTTGCTGTG | CTTAATACCC | | |
| | L F S | L L L | E G L T | L L C | L I P | | Gene NSs |
| | L V L | L T L G | G V N | L A V | L N T H | | Gene N |
| 301 | ATTTCCCTGG | AAACCAGTCC | ATTCCACTGC | CTGACTACGG | ACTTACCATA | | |
| | I S L E | T S P | F H C | L T T D | L P Y | | Gene NSs |
| | F P G | N Q S | I P L P | D Y G | L T I | | Gene N |
| 351 | CACAGAGTCT | CCGTTACCT | AGCACGATGG | GCATTGTACC | TTATCGCCCC | | |
| | T E S | P V T * | | | | | Gene NSs |
| | H R V S | G Y L | A R W | A L Y L | I A P | | Gene N |
| 401 | TAGTCCATAT | TCTGACAGAG | ACATCGTCCG | GACCACTTTC | ATCGTGCCAA | | |
| | S P Y | S D R D | I V R | T T F | I V P I | | Gene N |
| 451 | TTGCCGAGAA | GAATGGCATT | ACATGGTGCG | ATGGTGTAAC | AATGTATCTG | | |
| | A E K | N G I | T W C D | G V T | M Y L | | Gene N |
| 501 | GCCTTTTTGC | CTGGCTCCGA | AATGTTCATG | TCCACATTTA | GGTTCTTCCC | | |
| | A F L P | G S E | M F M | S T F R | F F P | | Gene N |
| 551 | GCTGACCATC | GGAATGTACA | AGGTGCAGAG | ATGGGGCATG | GACCCTAAAT | | |
| | L T I | G M Y K | V Q R | W G M | D P K C | | Gene N |
| 601 | GTCTAGAAAA | GGCGATATGG | CAACGGTATG | CGGGCATCGG | TGCAGACACG | | |
| | L E K | A I W | Q R Y A | G I G | A D T | | Gene N |
| 651 | TGGATACAGA | AAGAGTATGC | AGATATCAAC | GCGCGTTTCT | CAGTCGTTGA | | |
| | W I Q K | E Y A | D I N | A R F S | V V E | | Gene N |
| 701 | GTCGCTGGAT | TGGGCTAGAA | CTGCTTTTAC | AAGCACAGCC | AGAGAGTTCG | | |
| | S L D | W A R T | A F T | S T A | R E F V | | Gene N |
| 751 | TGGCCCAGTT | CGGAATCAAG | TTAGCGTAAT | ATCATTGAGC | ACAGTTGCAA | | |
| | A Q F | G I K | L A * | | | | Gene N |
| 801 | TTTTTCAGAGT | CCAGTAAATT | AGGGCCAACA | AAAGATAACA | GCAAAATGGG | | |
| 851 | TGGGTGGTTG | GGGACACGAA | CATTATTACA | TACGTGAATT | CATTTATCAG | | |
| 901 | GTATAGAATT | GGTGGAGCAC | ACTACT | | | | |

continua.

(m) VVIN – cepa 75V-807

```

1 AGTAGTGTGC TCCACTTGAA TAACTTGAAG ACCTTGAACG AGCTTATTGA
51 TACCCAGCCT TTCACTTGTC GTTATGATAG AACTAATCTT TAAAGATGAA
      M I E L I F K D E      Gene N
      M N                      Gene NSs
101 CCGTCATTCA CAGACAATAC ATTTGACCCG GAAGCTGCTT TTCTTAGATT
      P S F T D N T F D P E A A F L R F      Gene N
      R H S Q T I H L T R K L L F L D S      Gene NSs
151 CGAAAGTGTA TACGGCCAAC AATTGGTGGC CGCTGTCGTC CGAGTCTTCT
      E S V Y G Q Q L V A A V V R V F Y      Gene N
      K V Y T A N N W W P L S S E S S      Gene NSs
201 ACATCAACGC AGCGAAGGTC AAAGCTTACC TCAGAAGGTC AAGAGAACTC
      I N A A K V K A Y L R R S R E L      Gene N
      T S T Q R R S K L T S E G Q E N S      Gene NSs
251 CTGGTTTTCC TTACTCTTGG TGGTGTAAAC CTTGCGGTAC TTAACACACA
      L V F L T L G G V N L A V L N T H      Gene N
      W F S L L L V V L T L R Y L T H I      Gene NSs
301 TTTCCCCGGA ACCCAGTCCA TTCCACTGCC TGACTACGGT CTCACGATCC
      F P G T Q S I P L P D Y G L T I H      Gene N
      S P E P S P F H C L T T V S R S      Gene NSs
351 ACCGGATTTT GGGTTACTTC TCGAGATGGG CTTGTATCT AATAGCGACT
      R I S G Y F S R W A L Y L I A T      Gene N
      T G F R V T S R D G P C I *      Gene NSs
401 AACCTGAGT CAGATATCGC TCTGGTCCGA TCAACTTTTG TCGTGCCACT
      N P E S D I A L V R S T F V V P L      Gene N
451 GGCCGAAGAG AACGGTATTA CCTGGAGGGA CGGAGTGGAA ATGTACTTAG
      A E E N G I T W R D G V E M Y L A      Gene N
501 CGTTTTTGCC TGGTGCAGAG ATGTTTATGT CTACTTTTGA GTTCTACCCT
      F L P G A E M F M S T F E F Y P      Gene N
551 TTGACGATCG GGATGTATAG GGTCCGACGG TGGTCAATGG ACCCCAATG
      L T I G M Y R V R R W S M D P N C      Gene N
601 CCTCGAGAAG GCAATTTGGC AACGGTACAT GGGAATAGGA GCTGACCAGT
      L E K A I W Q R Y M G I G A D Q W      Gene N
651 GGATTACCAA GGAGACCGTT GCAATCCTGA CGCGTTTCGA CGCAGTGGAA
      I T K E T V A I L T R F D A V E      Gene N
701 AAGCTAGATT GGGCCCGGAC AGCGTTCACA AGTGCAGCTA GAGAGTTCGT
      K L D W A R T A F T S A A R E F V      Gene N
751 GATCCAATTT GGTATACGCT TAGCTTAATA TCCATAATAA CAATTGAAGT
      I Q F G I R L A *                      Gene N
801 TCTTAAAGTC TCGCAAATGG AGACAACATA AGCCAACAGC AAAACGGGTG
851 GGTGGTAGGG GAAACGAATA TATCAGGTTG TGTAATTCAT GAACTATATT
901 AAGAATTGGT GGAGCACACT ACT

```

continua.

Tabela 6 - Segmento P-ARN dos virus do grupo C

| Vírus | Nucleotídeos | | | | Nucleotídeos / Aminoácidos | |
|-----------------|--------------|--------|--------|---------|----------------------------|----------|
| | Total | 5' RNC | 3' RCN | A+U (%) | N | NSs |
| Apeu | 916 | 76 | 135 | 57,5 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Nepuyo | 918 | 75 | 138 | 55,2 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Gumbo Limbo | 915 | 76 | 134 | 54,9 | 705 / 234 | 276 / 91 |
| <i>Marituba</i> | 917 | 75 | 137 | 56,9 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| <i>Oriboca</i> | 920 | 75 | 140 | 53,3 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Murutucu | 924 | 75 | 144 | 53,6 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Restan | 919 | 73 | 141 | 54 | 705 / 234 | 276 / 91 |
| <i>Caraparu</i> | 922 | 76 | 141 | 54,1 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Bruconha | 922 | 76 | 141 | 54,1 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Ossa | 921 | 76 | 140 | 54,2 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Itaqui | 920 | 76 | 139 | 53,4 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| Vinces | 923 | 74 | 145 | 53,5 | 705 / 234 | 297 / 98 |
| <i>Madrid</i> | 926 | 74 | 147 | 53,8 | 705 / 234 | 276 / 91 |

RNC: região não codificante; N: gene codificador da possível proteína estrutural de nucleocapsídeo; NSs: gene codificador da possível proteína não estrutural NSs; A+U (%): percentual de adenina e uracila.

3.4 O SEGMENTO M-ARN DOS VÍRUS DO GRUPO C: SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA PARCIAL DO GENE Gn.

A seqüência nucleotídica de 345nt foi obtida para o segmento M-ARN de sete vírus protótipos do grupo C (VAPEU, VMTB, VORI, VMUR, VRES, VCAR e VITQ) e para a cepa Be H 5546 mediante o seqüenciamento dos clones selecionados contendo os respectivos fragmentos. As seqüências mostraram considerável homologia com a sequencia parcial do gen Gn de outros ortobunyavírus localizado no primeiro terço do segmento genômico M desses vírus e corresponderam as posições nucleotídicas de 193-573, 168-513 e 259-602 em comparação com a mesma região de membros representativos dos grupos California (vírus *La Crosse*), Simbu (vírus *Oropouche*) e Bunyamwera (vírus *Bunyamwera*). As seqüências nucleotídicas parciais do segmento M-ARN obtidas para os vírus do grupo C encontra-se sumarizadas na Figura 14.

(a) VAPEU – cepa BeAn 848

```

1  ACCAAATTCT ATAGAAGTTA CATTGTCGCA GACTGGAGTG ATTGTCACCC
   T K F Y R S Y I V A D W S D C H P      Gene Gn
51  AGTAGAAGTC GCTAATGGCC CAATCATGAT ATTTAACCCCT GGAAACGATC
   V E V A N G P I M I F N P G N D L      Gene Gn
101 TGATGTTAAT ACCAGAAACA TATGCTTGCC GCGCAGATTG CTCTCTCACG
   M L I P E T Y A C R A D C S L T      Gene Gn
151 TTAGATAGGG ATGAGGCTGA GGTAATCTTA CATTCTGATA AACTAAATCA
   L D R D E A E V I L H S D K L N H      Gene Gn
201 CTTTGAGGTC ATGGGGACTA CAACAGCTAC ACGCTGGTTC CAAGGTAGCA
   F E V M G T T T A T R W F Q G S T      Gene Gn
251 CCACATATTC CTTTGATCAC ACTTGTTGAGC ACATACAAGT TACATGTGGA
   T Y S L D H T C E H I Q V T C G      Gene Gn
301 TCAAAGAGCT TAAACTTCCA TGCTTGCTTC AACCAACATA TGTCA
   S K S L N F H A C F N Q H M S      Gene Gn

```

(b) VCAR – cepa BeAn 3994

```

1  ACGAAATTCT ACAGAAGCTA TATTGTTTCA GACTGGAGTG ACTGTCATCC
   T K F Y R S Y I V S D W S D C H P      Gene Gn
51  TGTAGAAGTC GCTAATGGCC CCATCATGAT CTTTAATCCA GGTAGCGATC
   V E V A N G P I M I F N P G S D L      Gene Gn
101 TAATGTTAAT ACCAGAGACA TATGCTTGCC GAGCTGATTG TTCTCTTACA
   M L I P E T Y A C R A D C S L T      Gene Gn
151 TTAGATAGGG ACGAGGCTGA AGTCATATTG CATTCTGATA AATTAATAAA
   L D R D E A E V I L H S D K L N N      Gene Gn
201 CTTTGAAGTC ATGGGGCACTA CAACGGCTAC ACGATGGTTC CAAGGCAGCA
   F E V M G T T T A T R W F Q G S T      Gene Gn
251 CCTCATATTC CCTTGAACAC ACATGTGAGC ACATTCAAGT CACATGTGGT
   S Y S L E H T C E H I Q V T C G      Gene Gn
301 TCAAAGAGCC TTAACTTCCA TGCATGCTTC AATCAACATA TGTCA
   S K S L N F H A C F N Q H M S      Gene Gn

```

Figura 14 – Seqüências nucleotídicas parciais do gene Gn, segmento M-ARN (345 nt) obtidas para sete protótipos virais do grupo C e para a amostra BeH 5546. Letras em caixa alta correspondem a seqüência de aminoácidos transcritas a partir das seqüências nucleotídicas. continua.

(c) VCAR – cepa BeH 5546

1 ACGAAATTCT ACAGAAGCTA TATTGTTTCT GACTGGAGTG ACTGTCATCC
 T K F Y R S Y I V S D W S D C H P Gene Gn
 51 TGTAGAAGTC GCTAATGGCC CAATCATGAT CTTTAATCCA GGTAGCGATC
 V E V A N G P I M I F N P G S D L Gene Gn
 101 TTATGTTAAT ACCAGAGACT TATGCTTGCC GAGCTGATTG TTCTCTTACA
 M L I P E T Y A C R A D C S L T Gene Gn
 151 TTAGATAGGG ACGAGGCTGA AGTTATATTG CATTCTGATA AATTAATAA
 L D R D E A E V I L H S D K L N N Gene Gn
 201 CTTTGAAGTC ATGGGCACTA CAACGGCTAC ACGATGGTTC CAAGGCAGCA
 F E V M G T T T A T R W F Q G S T Gene Gn
 251 CCTCATATTC CTTGAGCAC ACATGTGAGC ACATTCAAGT CACATGTGGT
 S Y S L E H T C E H I Q V T C G Gene Gn
 301 TCAAAGAGCC TTAACTTCCA TGCATGCTTC AATCAACATA TGTC A
 S K S L N F H A C F N Q H M S Gene Gn

(d) VITQ – cepa BeAn 12797

1 ACAAAGCTTT ACAGATCATA CATAGTAAGC GATTGGTCTG AGTGTAACCC
 T K L Y R S Y I V S D W S E C N P Gene Gn
 51 TGTGGAGACA GCCAACGGCC CGATCATGAT TTTTCAGCCA AACAACGAGT
 V E T A N G P I M I F Q P N N E L Gene Gn
 101 TAATCCTAAC ACCTAAGACA TACGCTTGTA GGATGGACTG TACTATTTCC
 I L T P K T Y A C R M D C T I S Gene Gn
 151 TTAGACAAAG AAGAGGCAAC AATCATCCTA CATTCCGACA AACTGAATCA
 L D K E E A T I I L H S D K L N H Gene Gn
 201 TTATGAGGTT ATGGGTACGA CAACAGCAAC TAGATGGTTC CAGGGGAGCA
 Y E V M G T T T A T R W F Q G S T Gene Gn
 251 CGAGTTATTC ACTTGACCAT ACTTGTGAAC ATATCCAAGT GACTTGTGGA
 S Y S L D H T C E H I Q V T C G Gene Gn
 301 TCTAAGACTC TGAATTTTCA TGCATGCTTC AATCAACATA TGTC A
 S K T L N F H A C F N Q H M S Gene Gn

(e) VMTB – cepa BeAn 15

1 ATAAAGCCTT ACAGGTCGTA CATTGTAAAA GAATGGTCTG AATGCAATCC
 I K P Y R S Y I V K E W S E C N P Gene Gn
 51 CATAGAGTCA GCAAACGGAT CAATCATGGT AATCGAGCCC ACTAACGATG
 I E S A N G S I M V I E P T N D G Gene Gn
 101 GAATGCTCGT AACTAAATCT TACGCATGTA GAGTGGACTG TGCTATTACC
 M L V T K S Y A C R V D C A I T Gene Gn
 151 TTAGACAAGG AAGAAGCCAC AATAATCCTG CATACCGATA ACTTTAATAA
 L D K E E A T I I L H T D N F N N Gene Gn
 201 TTATGAAATT ATGGGGACAA CTACAGCGTC TAGGTGGTTT CAGAGTACCA
 Y E I M G T T T A S R W F Q S T T Gene Gn
 251 CGATTTATTC ACTAGAGCAG ACATGCGAAG ATCTCCAAGT AACTTGCGGC
 I Y S L E Q T C E H L Q V T C G Gene Gn
 301 TCTAAGTGTC TCAGTTTTCA TGCCTGCTTT AATCAGCATA TGTC A
 S K C L S F H A C F N Q H M S Gene Gn

continua

(f) VMUR – cepa BeAn 974

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| 1 | ATAAAGCCAT | ATAGGTCGTA | TATTGTCAAG | GAATGGTCTG | AGTGCAACCC | |
| | I K P Y | R S Y | I V K | E W S E | C N P | Gene Gn |
| 51 | CAAAGAGTCC | GCAAACGGAC | CAATCATGGT | AATTGAGCCT | ACAAACGATG | |
| | K E S | A N G P | I M V | I E P | T N D G | Gene Gn |
| 101 | GGATGCTAGT | AACCAAATCA | TACGCATGCA | GAGTGGATTG | TGCTATAACC | |
| | M L V | T K S | Y A C R | V D C | A I T | Gene Gn |
| 151 | TTAGACAAGG | ATGAAGCCTC | AATAATCCTA | CATACTGATA | ACTTTAATAA | |
| | L D K D | E A S | I I L | H T D N | F N N | Gene Gn |
| 201 | CTATGAAATC | ATGGGGACAA | CTACGGCGTC | AAGGTGGTTC | CAGAGTACTA | |
| | Y E I | M G T T | T A S | R W F | Q S T T | Gene Gn |
| 251 | CGATATATTC | ACTAGATCAG | ACATGCGAGC | ATCTACAAGT | AACATGCGGC | |
| | I Y S | L D Q | T C E H | L Q V | T C G | Gene Gn |
| 301 | TCAAAGTGCC | TCAGCTTTCA | TGCATGCTTT | AATCAGCATA | TGTCA | |
| | S K C L | S F H | A C F | N Q H M | S | Gene Gn |

(g) VORI – cepa BeAn 17

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| 1 | ACAAAGCTAT | ACAGATCTTA | TATAGTAAGT | GATTGGTCTG | AATGTAATCC | |
| | T K L Y | R S Y | I V S | D W S E | C N P | Gene Gn |
| 51 | TGTAGAAACA | GCCAATGGCC | CGATTATGAT | TTTCCAACCA | AATAAAGAGT | |
| | V E T | A N G P | I M I | F Q P | N K E L | Gene Gn |
| 101 | TGATCTTAAC | TCCTAAAACA | TATGCTTGTA | GAATGGACTG | CTCTATCTCC | |
| | I L T | P K T | Y A C R | M D C | S I S | Gene Gn |
| 151 | TTAGATAAAG | AAGAAGCAAC | AATAATTCTA | CATTCAGATA | AACTAAATCA | |
| | L D K E | E A T | I I L | H S D K | L N H | Gene Gn |
| 201 | TTATGAAGTT | ATGGGAACGA | CAACTGCAAC | AAGATGGTTT | CAGGGGAGTA | |
| | Y E V | M G T T | T A T | R W F | Q G S T | Gene Gn |
| 251 | CGAGCTATTC | TCTTGAACAC | ACTTGTGAAC | ATGTCCAAGT | GACCTGTGGA | |
| | S Y S | L E H | T C E H | V Q V | T C G | Gene Gn |
| 301 | TCAAAGACAT | TGAATTTTCA | TGCTTGCTTC | AATCAACATA | TGTCA | |
| | S K T L | N F H | A C F | N Q H M | S | Gene Gn |

continua

(h) VRES – cepa TRVL 51144

| | | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| 1 | ATAAAGCCCT | ATAGAAAGTA | TATAGTAAAG | GAGTGGCATG | AGTGTAACCC | |
| | I K P Y | R K Y | I V K | E W H E | C N P | Gene Gn |
| 51 | TAAGGAGAGA | GCAAACGGTC | CGATCATGGT | TATAGAGCCT | ACCAACGATG | |
| | K E R | A N G P | I M V | I E P | T N D G | Gene Gn |
| 101 | GCATGCTAGT | ATCAAAAGCA | TATGCATGCA | GCGTGGATTG | CGCTCTAACC | |
| | M L V | S K A | Y A C S | V D C | A L T | Gene Gn |
| 151 | TTAGATAAGG | ATGAAGCTTC | GATAATCCTG | CATACAGATA | ACTTCAATAA | |
| | L D K D | E A S | I I L | H T D N | F N N | Gene Gn |
| 201 | CTATGAGTTC | ATGGGGACTA | CTACAGCGTC | GAGGTGGTTC | CAGAGCACTA | |
| | Y E F | M G T T | T A S | R W F | Q S T T | Gene Gn |
| 251 | CCATATATTC | ACTAGAACAG | ACTTGCGAGC | ATCTACAAGT | GACATGCGGG | |
| | I Y S | L E Q | T C E H | L Q V | T C G | Gene Gn |
| 301 | TCAAAGTGTC | TGCACTTTCA | TGCCTGCTTT | AACCAGCATA | TGTCA | |
| | S K C L | H F H | A C F | N Q H M | S | Gene Gn |

Figura 14 – Seqüências nucleotídicas parciais do gene Gn, segmento M-ARN (345 nt) obtidas para sete protótipos virais do grupo C e para a amostra BeH 5546. Letras em caixa alta correspondem a seqüência de aminoácidos transcritas a partir das seqüências nucleotídicas.

3.5 RELAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS VÍRUS DO GRUPO C

Análise das seqüências nucleotídicas obtidas para o gene N (segmento P-ARN) dos vírus do grupo, evidenciou diferentes percentuais de homologia variando de 69,6% a 99,3%. As seqüências aminoacídicas transcritas a partir das seqüências nucleotídicas, mostraram maior grau de homologia com percentuais que variaram entre 74,0% 99,6%. Para o segmento P, os vírus do grupo C estabeleceram pares genéticos específicos entre os VAPEU↔VMTB, VORI ↔VMUR, e VCAR ↔ VITQ, com percentuais de identidade nucleotídica de 94,2%, 95,5% e 95,0%, respectivamente. O VBCR apresentou 99,3% de identidade nucleotídica com o VCAR, não podendo ser distinguido geneticamente deste último. O VMAD apresentou o

menor grau de relacionamento genético com os demais vírus do grupo C variando de 69,6% a 72,6 %, tendo sido considerado o vírus geneticamente mais distinto (Tabela 7). As análises genéticas do segmento P para amostras do VORI isolados de diferentes localidades e hospedeiros (humanos, camundongos sentinelas e artrópodes) mostraram baixa divergência nucleotídica que variou de 0-1,4%. Para as amostras do VMUR, encontrou-se divergência entre suas seqüências de nucleotídeos de 0,4 a 1,4%, enquanto que para amostras referentes ao vírus VNEP, os valores determinados situaram-se entre 0,6% a 1,0%. A cepa BeAn 346113 mostrou homologia de 98,9% com o protótipo do VITQ BeAn 12797. Para o VCAR, todas as amostras analisadas mostraram resultados dentro do esperado, com divergência nucleotídica entre 0,3% e 1,0%, exceto para a cepa BeH 5546 que evidenciou divergência média de 21,1% com as amostras do VCAR, por outro lado alto grau de homologia (entre 95,9 e 96,5%) com o segmento P-ARN das amostras do VORI (Tabela 8).

Em relação ao gene Gn (segmento M-ARN), a análise das seqüências parciais (345 nt) obtidas para os sete protótipos virais do grupo C e para a amostra BeH 5546, evidenciou graus de homologia para suas seqüências nucleotídicas e aminoacídicas variando de 62,3% a 98,3% e de 64,3% a 100%, respectivamente, havendo formação de pares genéticos específicos entre os VMTB ↔ VMUR, VORI ↔ VITQ e VAPEU ↔ VCAR. A cepa viral Be H 5546 evidenciou 98,3% de homologia com a seqüência nucleotídica da amostra protótipo do VCAR Be An 3994 (Tabela 9).

Tabela 7 – Relação genética dos vírus do grupo C baseado na seqüência nucleotídica do gene N, segmento P-ARN

| Vírus* | Identidade nucleotídica (%) | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|------|------|-------|------|-------|
| | VAPEU | VMTB | VMUR | VORI | VCAR | VITQ | VBCR | VGL | VMAD | VNEP | VOSSA | VRES | V VIN |
| VAPEU | *** | 94,2 | 80,6 | 82,6 | 75,5 | 75,5 | 75,7 | 82,6 | 76,6 | 90,1 | 75,6 | 81,0 | 76,5 |
| VMTB | 98,7 | *** | 80,3 | 81,8 | 75,6 | 74,9 | 75,6 | 82,4 | 76,5 | 91,1 | 75,9 | 80,9 | 75,6 |
| VMUR | 88,9 | 89,8 | *** | 95,5 | 84,3 | 82,6 | 84,1 | 77,6 | 72,6 | 82,1 | 83,4 | 91,1 | 81,8 |
| VORI | 90,2 | 89,4 | 97,9 | *** | 82,7 | 81,4 | 82,7 | 78,6 | 73,5 | 84,0 | 82,6 | 90,9 | 81,6 |
| VCAR | 87,2 | 86,4 | 91,5 | 92,8 | *** | 95,0 | 99,3 | 75,6 | 69,8 | 75,9 | 97,9 | 83 | 86,4 |
| VITQ | 86,0 | 85,5 | 90,2 | 91,1 | 97,9 | *** | 95,3 | 75,7 | 69,9 | 75,3 | 94,8 | 81,7 | 89,8 |
| VBCR | 87,2 | 86,4 | 91,5 | 92,8 | 99,6 | 97,9 | *** | 75,6 | 69,8 | 75,7 | 97,9 | 82,7 | 87,0 |
| VGL | 89,4 | 88,5 | 85,5 | 86,8 | 84,3 | 83,4 | 84,3 | *** | 78,6 | 86,1 | 76 | 79,4 | 76,2 |
| VMAD | 79,1 | 78,3 | 76,2 | 77,0 | 74,5 | 74,9 | 74,5 | 77,4 | *** | 77,7 | 69,6 | 72,9 | 70,8 |
| VNEP | 96,6 | 95,7 | 89,8 | 90,2 | 86,8 | 85,5 | 86,8 | 90,2 | 79,1 | *** | 75,6 | 82,3 | 76,3 |
| VOSSA | 86,8 | 86,0 | 91,1 | 92,3 | 99,1 | 97,4 | 99,1 | 84,3 | 74,0 | 86,4 | *** | 83,4 | 86,8 |
| VRES | 88,9 | 88,1 | 96,2 | 96,2 | 92,8 | 91,1 | 92,8 | 86,8 | 76,6 | 89,4 | 92,3 | *** | 82,4 |
| V VIN | 83,8 | 83,8 | 88,1 | 88,5 | 93,2 | 93,6 | 93,2 | 82,1 | 74,9 | 84,3 | 93,6 | 87,7 | *** |
| | Identidade aminoacídica (%) | | | | | | | | | | | | |

As áreas sombreadas em cinza representam os pares genéticos formados entre os VAPEU ↔ VMTB, VMUR ↔ VORI, VCAR ↔ VITQ. Os valores negritados em azul correspondem as identidades nucleotídicas e aminoacídicas entre os VCAR e VBCR. * Vírus protótipos.

Tabela 8 – Relação genética dos vírus do grupo C baseado na seqüência nucleotídica do gene N, segmento P-ARN para cepas dos VORI, VMUR, VNEP, VCAR.

| | | Identidade nucleotídica (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|--------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | | VCAR | | | | | VITQ | | VMTB | | | | VMUR | | | | VNEP | | | | VORI | | | | |
| | | 190 863 | IQU 212 | 299789 | Be H 5546 | Be An 3994* | 346113 | 12797 | 258481 | 186247 | H 119190 | Be An 15* | IQT 9891 | IQU 126 | 257944 | Be An 974* | 10709 | 275424 | 225808 | 18462* | 263748 | 246614 | 142102 | LCVP 217 | Be An 17* |
| VCAR | Be H 190 863 | *** | 99.7 | 99.3 | 81.7 | 99.4 | 95.2 | 94.9 | 75.5 | 75.6 | 76.2 | 75.5 | 84.1 | 83.8 | 83.8 | 84.1 | 75.9 | 76.2 | 76.3 | 75.7 | 82.1 | 82.4 | 81.8 | 81.8 | 82.4 |
| | IQU 212 | 0.3 | *** | 99.0 | 81.6 | 99.3 | 95.0 | 94.8 | 75.6 | 75.7 | 76.3 | 75.6 | 84.0 | 83.7 | 83.7 | 84.0 | 75.9 | 76.2 | 76.3 | 75.7 | 82.0 | 82.3 | 81.7 | 81.7 | 82.3 |
| | Be Ar 299789 | 0.7 | 1.0 | *** | 81.6 | 99.3 | 94.8 | 94.9 | 75.7 | 75.9 | 76.3 | 75.9 | 84.1 | 83.8 | 83.8 | 84.1 | 76.2 | 76.2 | 76.3 | 76.0 | 82.3 | 82.6 | 82.0 | 82.0 | 82.6 |
| | Be H 5546 | 21.2 | 21.3 | 21.4 | *** | 82.1 | 80.9 | 81.4 | 81.3 | 81.6 | 81.3 | 81.4 | 93.6 | 93.5 | 93.3 | 93.9 | 83.7 | 83.8 | 83.8 | 84.0 | 95.9 | 96.5 | 95.2 | 95.2 | 96.5 |
| | Be An 3994* | 0.6 | 0.7 | 0.7 | 20.6 | *** | 95.0 | 95.0 | 75.6 | 75.9 | 76.0 | 75.6 | 84.3 | 84.0 | 84.0 | 84.3 | 76.0 | 76.3 | 76.5 | 75.9 | 82.4 | 82.7 | 82.1 | 82.1 | 82.7 |
| VITQ | Be An 346113 | 5.0 | 5.1 | 5.4 | 22.2 | 5.1 | *** | 98.9 | 75.0 | 75.3 | 75.0 | 75.0 | 82.4 | 82.3 | 82.1 | 82.3 | 75.7 | 75.9 | 75.9 | 75.5 | 80.4 | 81.0 | 80.3 | 80.3 | 81.0 |
| | Be An 12797 | 5.3 | 5.5 | 5.3 | 21.5 | 5.2 | 1.1 | *** | 74.9 | 75.2 | 74.9 | 74.9 | 82.7 | 82.6 | 82.4 | 82.6 | 75.6 | 75.7 | 75.7 | 75.3 | 80.9 | 81.4 | 80.7 | 80.7 | 81.4 |
| VMTB | Be An 258481 | 30.0 | 29.8 | 29.5 | 21.7 | 29.8 | 30.6 | 30.8 | *** | 99.6 | 99.0 | 99.6 | 80.3 | 80.7 | 80.1 | 80.3 | 90.4 | 90.2 | 90.5 | 90.9 | 81.3 | 81.6 | 81.7 | 81.7 | 81.6 |
| | Be AR 186247 | 29.8 | 29.6 | 29.3 | 21.3 | 29.3 | 30.1 | 30.3 | 0.4 | *** | 99.3 | 99.4 | 80.4 | 80.6 | 80.0 | 80.7 | 90.4 | 90.2 | 90.5 | 90.9 | 81.6 | 81.8 | 82.0 | 82.0 | 81.8 |
| | Be H 119190 | 28.9 | 28.7 | 28.7 | 21.7 | 29.1 | 30.5 | 30.8 | 1.0 | 0.7 | *** | 99.0 | 80.3 | 80.4 | 79.9 | 80.6 | 89.6 | 89.5 | 89.8 | 90.2 | 81.3 | 81.6 | 81.7 | 81.7 | 81.6 |
| | Be An 15* | 30.0 | 29.8 | 29.3 | 21.5 | 29.8 | 30.6 | 30.8 | 0.4 | 0.6 | 1.0 | *** | 80.1 | 80.4 | 80.0 | 80.3 | 90.5 | 90.4 | 90.6 | 91.1 | 81.6 | 81.8 | 82.0 | 82.0 | 81.8 |
| VMUR | IQT 9891 | 17.9 | 18.1 | 17.9 | 6.7 | 17.7 | 20.1 | 19.7 | 23.2 | 23.0 | 23.2 | 23.3 | *** | 99.6 | 99.6 | 98.7 | 81.8 | 81.8 | 81.8 | 82.0 | 94.6 | 95.2 | 93.9 | 93.9 | 95.2 |
| | IQU 126 | 18.3 | 18.4 | 18.3 | 6.9 | 18.1 | 20.3 | 19.9 | 22.6 | 22.8 | 23.0 | 23.0 | 0.4 | *** | 99.4 | 98.6 | 82.0 | 82.0 | 82.0 | 82.1 | 94.6 | 95.2 | 93.9 | 93.9 | 95.2 |
| | Be H 257944 | 18.3 | 18.4 | 18.3 | 7.0 | 18.1 | 20.4 | 20.1 | 23.3 | 23.5 | 23.7 | 23.5 | 0.4 | 0.6 | *** | 98.7 | 81.7 | 81.7 | 81.7 | 81.8 | 94.3 | 94.9 | 93.6 | 93.6 | 94.9 |
| | Be An 974* | 17.9 | 18.1 | 17.9 | 6.4 | 17.7 | 20.3 | 19.9 | 23.1 | 22.5 | 22.7 | 23.1 | 1.3 | 1.4 | 1.3 | *** | 82.0 | 82.0 | 82.0 | 82.1 | 94.9 | 95.5 | 94.2 | 94.2 | 95.5 |
| VNEP | Be An 10709 | 29.3 | 29.3 | 28.8 | 18.5 | 29.1 | 29.4 | 29.6 | 10.4 | 10.4 | 11.2 | 10.2 | 20.9 | 20.7 | 21.1 | 20.7 | *** | 99.4 | 98.9 | 99.1 | 83.3 | 83.7 | 83.4 | 83.4 | 83.7 |
| | Be An 275424 | 28.9 | 28.9 | 28.8 | 18.3 | 28.7 | 29.3 | 29.4 | 10.5 | 10.5 | 11.4 | 10.4 | 20.9 | 20.7 | 21.1 | 20.7 | 0.6 | *** | 99.1 | 99.0 | 83.1 | 83.5 | 83.3 | 83.3 | 83.5 |
| | Be AR 225808 | 28.7 | 28.7 | 28.7 | 18.3 | 28.5 | 29.3 | 29.5 | 10.2 | 10.2 | 11.0 | 10.0 | 20.9 | 20.7 | 21.1 | 20.7 | 1.1 | 0.9 | *** | 99.3 | 83.1 | 83.5 | 83.3 | 83.3 | 83.5 |
| | TRVL 18462* | 29.6 | 29.6 | 29.1 | 18.1 | 29.3 | 29.9 | 30.1 | 9.7 | 9.7 | 10.5 | 9.5 | 20.7 | 20.5 | 20.9 | 20.5 | 0.9 | 1.0 | 0.7 | *** | 83.5 | 84.0 | 83.7 | 83.7 | 84.0 |
| VORI | Be An 263748 | 20.5 | 20.7 | 20.3 | 4.2 | 20.1 | 22.8 | 22.2 | 21.8 | 21.4 | 21.8 | 21.4 | 5.6 | 5.6 | 5.9 | 5.3 | 19.0 | 19.2 | 19.2 | 18.7 | *** | 99.4 | 99.1 | 99.1 | 99.4 |
| | Be Ar 246614 | 20.1 | 20.3 | 19.9 | 3.6 | 19.7 | 22.0 | 21.4 | 21.4 | 21.0 | 21.4 | 21.0 | 5.0 | 5.0 | 5.3 | 4.7 | 18.5 | 18.7 | 18.7 | 18.1 | 0.6 | *** | 98.6 | 98.6 | 100.0 |
| | Be H 142102 | 20.9 | 21.1 | 20.7 | 5.0 | 20.5 | 23.0 | 22.4 | 21.2 | 20.8 | 21.2 | 20.8 | 6.4 | 6.4 | 6.7 | 6.1 | 18.8 | 19.0 | 19.0 | 18.5 | 0.9 | 1.4 | *** | 100.0 | 98.6 |
| | LCVP 217 | 20.9 | 21.1 | 20.7 | 5.0 | 20.5 | 23.0 | 22.4 | 21.2 | 20.8 | 21.2 | 20.8 | 6.4 | 6.4 | 6.7 | 6.1 | 18.8 | 19.0 | 19.0 | 18.5 | 0.9 | 1.4 | 0.0 | *** | 98.6 |
| | Be An 17* | 20.1 | 20.3 | 19.9 | 3.6 | 19.7 | 22.0 | 21.4 | 21.4 | 21.0 | 21.4 | 21.0 | 5.0 | 5.0 | 5.3 | 4.7 | 18.5 | 18.7 | 18.7 | 18.1 | 0.6 | 0.0 | 1.4 | 1.4 | *** |

* Protótipos virais; *** 100% de homologia. Valores indicados em percentuais localizados acima e abaixo dos asteriscos correspondem a identidade e divergência nucleotídica, respectivamente. Valores em vermelho: homologia da cepa viral BeH 5546 com amostras do VCAR; valores em azul: homologia da amostra BeH 5546 com cepas do VORI.

Tabela 9 - Comparação entre as seqüências nucleotídicas e aminoacídicas para as seqüências nucleotídicas do segmento M-ARN, gene Gn dos vírus do grupo C.

| Vírus | Identidade nucleotídica (%) | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------|
| | VMTB | VMUR | VITQ | VORI | BeH 5546 | VAPEU | VCAR | VRES | V VIN |
| VMTB (BeAn 15) | *** | 88,7 | 75,9 | 73,3 | 64,9 | 62,3 | 64,6 | 79,7 | 70,4 |
| VMUR (BeAn 974) | 95,7 | *** | 71 | 69,6 | 66,1 | 69,3 | 66,1 | 85,2 | 67,5 |
| VITQ (BeAn 12797) | 70,4 | 70,4 | *** | 86,7 | 69,9 | 70,4 | 70,7 | 71,6 | 78,3 |
| VORI (BeAn 17) | 70,4 | 68,7 | 96,5 | *** | 71,3 | 72,5 | 71,6 | 69,9 | 78 |
| BeH 5546 | 65,2 | 66,1 | 80 | 80,9 | *** | 87 | 98,3 | 66,7 | 82,3 |
| VAPEU (BeAn 848) | 64,3 | 67 | 80,9 | 79,1 | 95,7 | *** | 87,2 | 71 | 77,1 |
| VCAR (BeAn 3994) | 65,2 | 66,1 | 80 | 80,9 | 100 | 95,7 | *** | 67,2 | 83,2 |
| VRES (TRVL 51144) | 88,7 | 91,3 | 66,1 | 66,1 | 65,2 | 64,3 | 65,2 | *** | 66,4 |
| V VIN (75V-807) | 69,6 | 71,3 | 82,6 | 83,5 | 89,6 | 87,8 | 89,6 | 67,8 | *** |
| | Identidade aminoacídica (%) | | | | | | | | |

Áreas sombreadas em cinza correspondem as identidades nucleotídicas e aminoacídicas para os pares genéticos estabelecidos entre VMTB ↔ VMUR, VITQ ↔ VORI, VCAR ↔ VAPEU. Valores em vermelho e azul correspondem as identidades nucleotídicas e aminoacídicas entre a cepa BeH 5546 e os VCAR e VORI, respectivamente.

3.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise das seqüências nucleotídicas para os 13 vírus protótipos pertencentes ao grupo C dos arbovírus utilizando modelos filogenéticos foi realizada com o objetivo de estabelecer a relação genética entre esses vírus e destes com outros ortobunyavírus. As árvores filogenéticas construídas pelos métodos de NJ e de MP evidenciaram topologias semelhantes mostrando valores de *bootstrap* consistentes. A análise filogenética comparativa dos vírus do grupo C com outros ortobunyavírus pertencentes aos grupos Simbu, California e Bunyamwera, tendo como base o segmento P-ARN, gene N, evidenciou que os membros do grupo C constituem um grupo monofilético, ou seja, vírus que compartilham ou foram originados de um ancestral comum, sendo geneticamente mais relacionados aos vírus do grupo Simbu, tais como os vírus *Oropouche*, *Aino*, *Akabane* e *Tinaroo*.

Os vírus do grupo C foram distribuídos em três grupos filogenéticos principais denominados I (VCAR, VBRC, VOSSA, VITQ e VVIN), II (VMUR, VORI e VRES), e III (VAPEU, VMTB e VNEP). O vírus VMAD, por ter sido geneticamente o mais distinto, posicionou-se fora dos três grupos acima mencionados, no entanto apresentou relacionamento genético forte o suficiente para permanecer dentro do grupo filogenético que encerra os vírus do grupo C (Figura 15). A árvore filogenética construída para as amostras dos VORI, VCAR, VITQ, VMUR, VNEP e VMTB, mostraram resultados esperados, onde as mesmas se relacionaram com seus respectivos protótipos virais, excetuando-se a cepa BeH 5546 do VCAR, que pela análise do segmento P-ARN foi associada ao VORI (Figura 16).

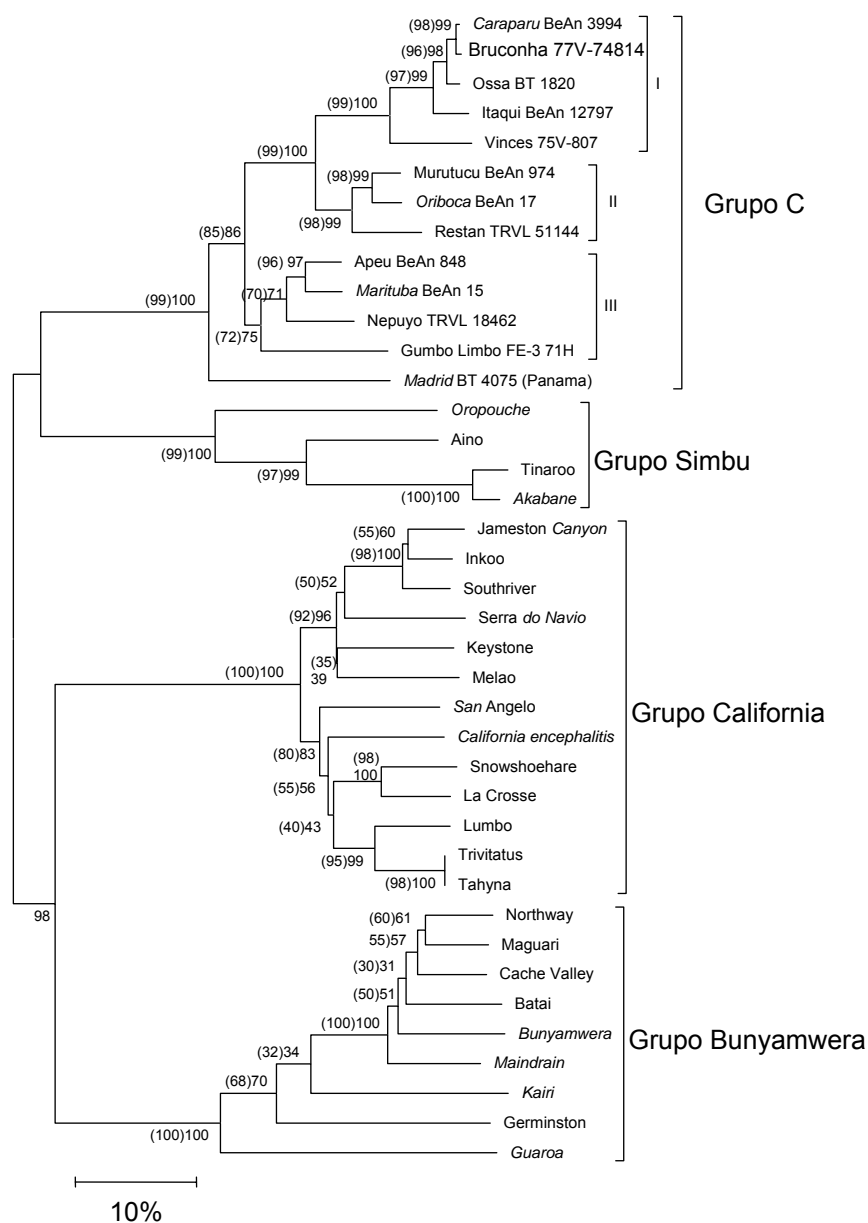


Figura 15 – Análise filogenética dos vírus do grupo C (gene N;P-ARN). Os vírus do grupo C foram distribuídos em três grupos filogenéticos (I,II e III). O percentual de *bootstrap* foi calculado para 1000 replicons. Valores dentro e fora dos parênteses correspondem aos percentuais obtidos para os métodos de MP e NJ, respectivamente. Membros dos grupos Simbu, Califórnia e Bunyamwera foram utilizados para análise filogenética comparativa. A escala em barra representa 10% de divergência nucleotídica.

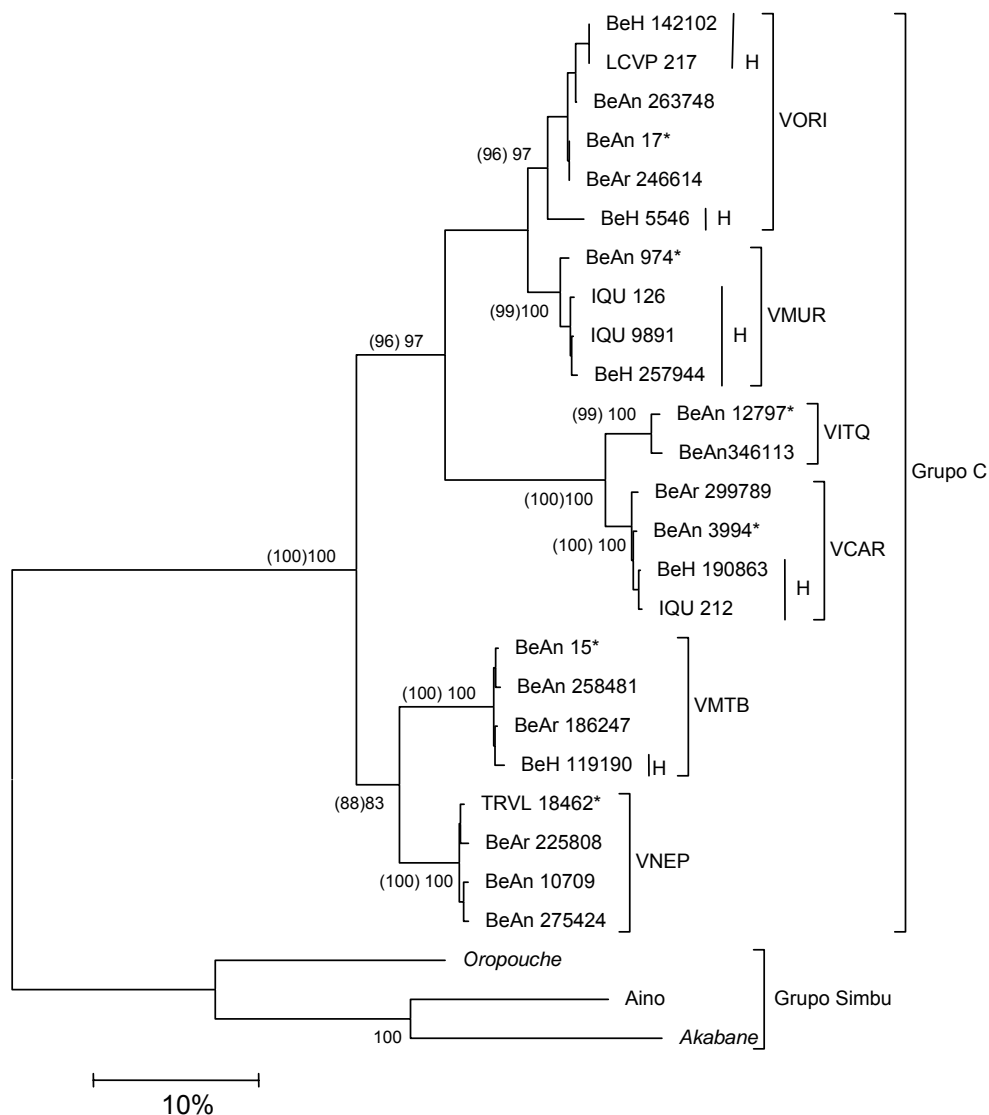


Figura 16 – Análise filogenética das amostras dos VORI, VMUR, VITQ, VCAR, VMTB e VNEP isolados de diferentes hospedeiros e áreas geográficas. H: corresponde a amostras isoladas de humanos. Percentuais de *bootstraps* obtidos para os métodos de MP e NJ, encontram-se dentro e fora dos parênteses, respectivamente. Membros do grupo Simbu foram utilizados como grupos externos para enraizamento da árvore. A escala representa 10% de divergência nucleotídica.

Os resultados obtidos pela análise das seqüências nucleotídicas parciais do gene G (M-ARN) para oito vírus do grupo C, evidenciou diferenças topológicas entre as árvores filogenéticas construídas para o segmento P e M. Observou-se a troca dos pares genéticos entre os VPEU, VMTB, VORI, VMUR, VCAR, VITQ, VRES e a cepa BeH 5546. A análise pelo método de MV mostrou que, independente do modelo evolutivo selecionado, as topologias geradas pelos métodos de NJ e MP para um determinado segmento genômico foram significativamente mais prováveis do que a topologia competitiva utilizando o outro segmento ($P < 0.001$). Estes resultados indicaram que as topologias obtidas para os segmentos P e M foram diferentes, sugerindo que cada segmento de ARN apresentou uma história evolutiva diferente (Figura 17).

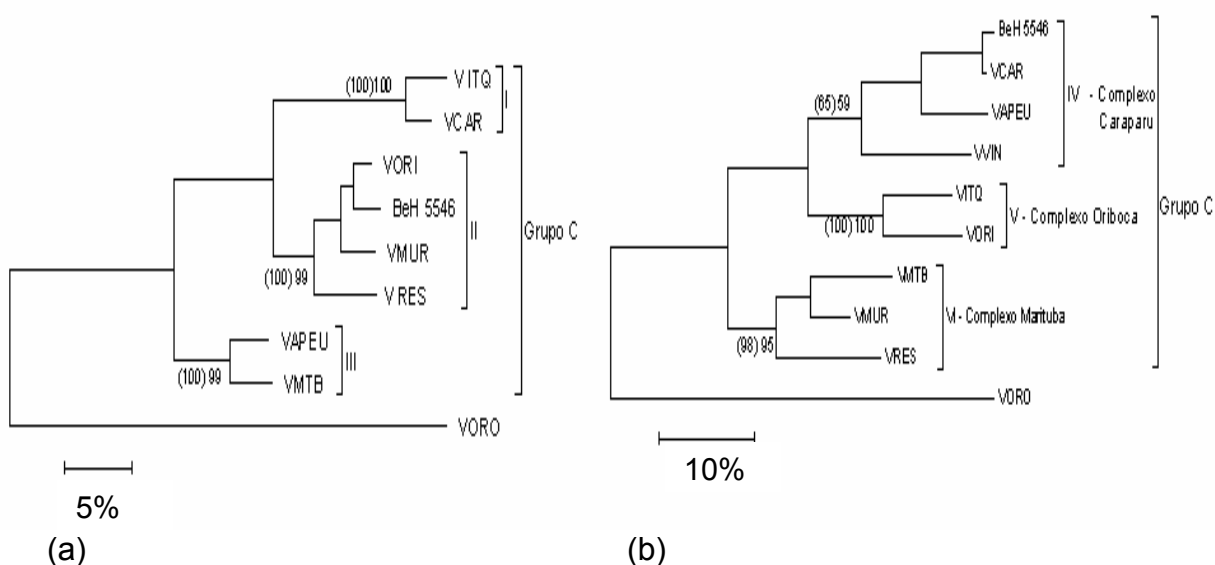


Figura 17 – Filogenia dos segmentos P (a) e M (b). Valores de *bootstraps* obtidos para os métodos de MP e NJ encontram-se localizados dentro e fora dos parêntesis, respectivamente. Os números exibidos nas barras em a e b representam 5% e 10% de divergência nucleotídica, respectivamente

3.7 RELAÇÃO ENTRE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E A GENÉTICA DOS VÍRUS PERTENCENTES AO GRUPO C.

A árvore filogenética construída para os vírus do grupo C utilizando as seqüências nucleotídicas para o segmento P-ARN mostrou que vírus oriundos de regiões geográficas distintas, tais como Brasil, Panamá, Trinidad, Equador e Estados Unidos, podem compartilhar o mesmo grupo genético, ou assumir posicionamentos diferentes dentro da topologia da árvore filogenética (Figura 18).

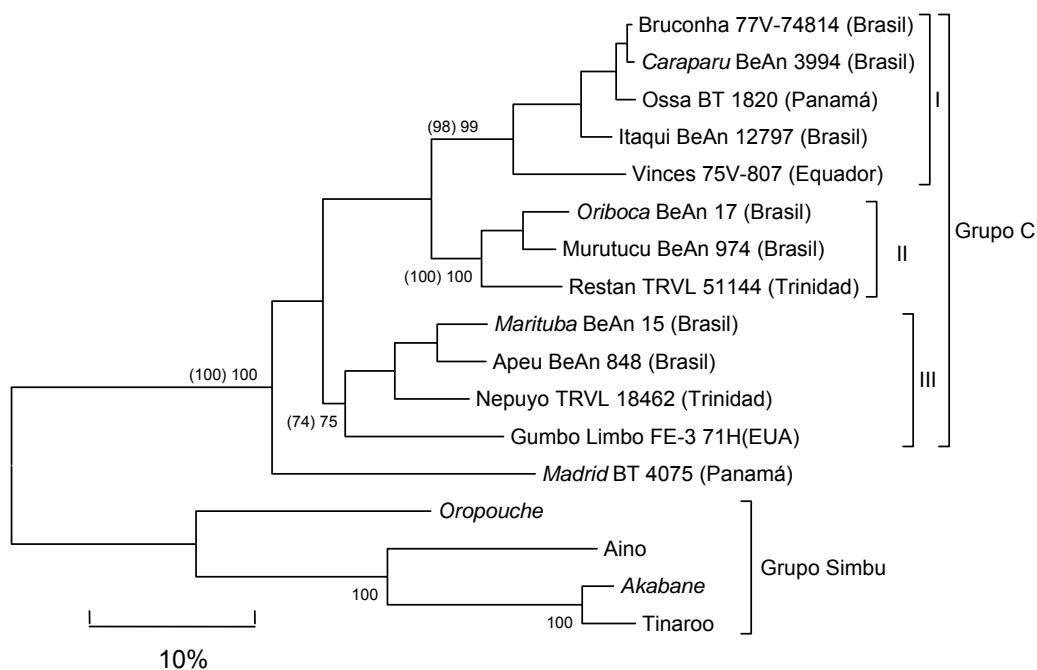


Figura 18 – Árvore filogenética construída para o segmento P-ARN (gene N) dos vírus do grupo C isolados de diferentes localidades das Américas. Valores dentro e fora dos parênteses indicam os percentuais de *bootstrap* obtidos para os métodos de MP e NJ, respectivamente. Os vírus do grupo Simbu foram utilizados como grupos externos para enraizamento da árvore. A escala representa 10% de divergência nucleotídica.

3.8 MODELO HIPOTÉTICO DE REARRANJO GENÉTICO DOS VÍRUS DO GRUPO C.

Como resultado da associação dos achados genéticos para os segmentos genômicos P-ARN e M-ARN aos dados antigênicos previamente descritos para os vírus do grupo C (Shope & Cousey, 1962; Shope *et al.*, 1988), estabeleceu-se um modelo hipotético, que a partir da co-infecção de células de hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados, sugere a geração de progenies virais após o rearranjo de seus segmentos genômicos no interior da célula infectada. Os vírus resultantes compreendem duas progenies com material genético idêntico aos vírus parentais e seis progenies cujos materiais genéticos são diferentes entre si e em relação aos vírus parentais que cederam seus segmentos de ARN (Figura 19). A aplicação deste modelo nos permitiu sugerir que os vírus rearranjados rG1M1P2 e rG2M2P1 são provavelmente as progenies virais envolvidas no mecanismo de rearranjo genético dos vírus do grupo C como um produto da troca de segmentos de ARN entre dois vírus parentais (Figura 20).

Em relação aos demais ortobunyavírus, o modelo idealizado para os vírus do grupo C foi capaz de sugerir possíveis padrões de rearranjo genético para os vírus Jatobal (grupo Simbu) e Ngari (grupo Bunyamwera) tendo como base informações genéticas a respeito dos seus segmentos P-ARN, M-ARN e G-ARN (Saeed *et al.*, 2001; Gerrard *et al.*, 2004). Ambos os vírus foram identificados como progenies do tipo rG1M2P1 (Figura 21).

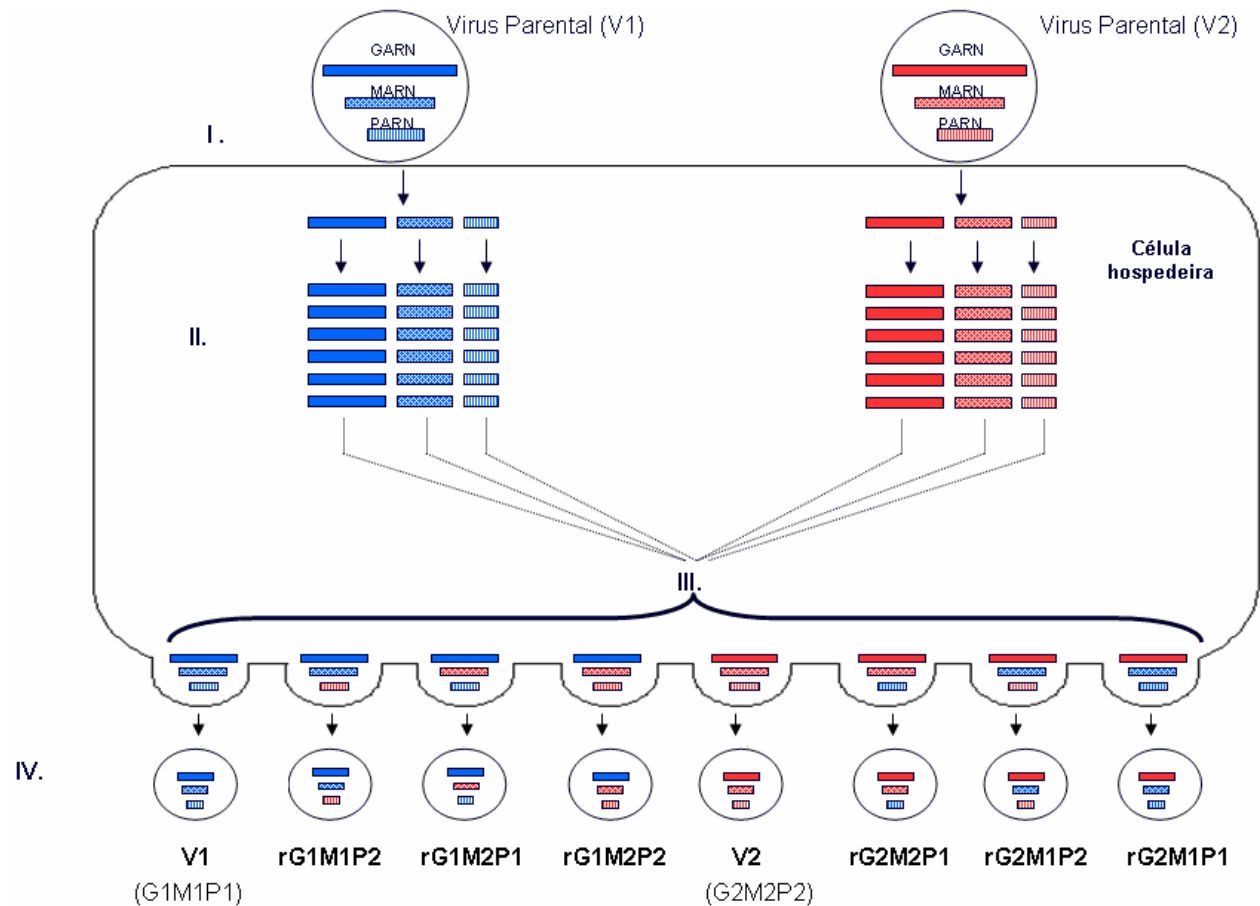


Figura 19 – Modelo hipotético de rearranjo viral para os vírus do grupo C. (I) Co-infecção de uma célula hospedeira (vertebrados ou invertebrados); II. Multiplicação do genoma viral; (III) Rearranjo dos segmentos de ARN; e (IV) Possíveis linhagens virais após o rearranjo dos segmentos de ARN genômicos.

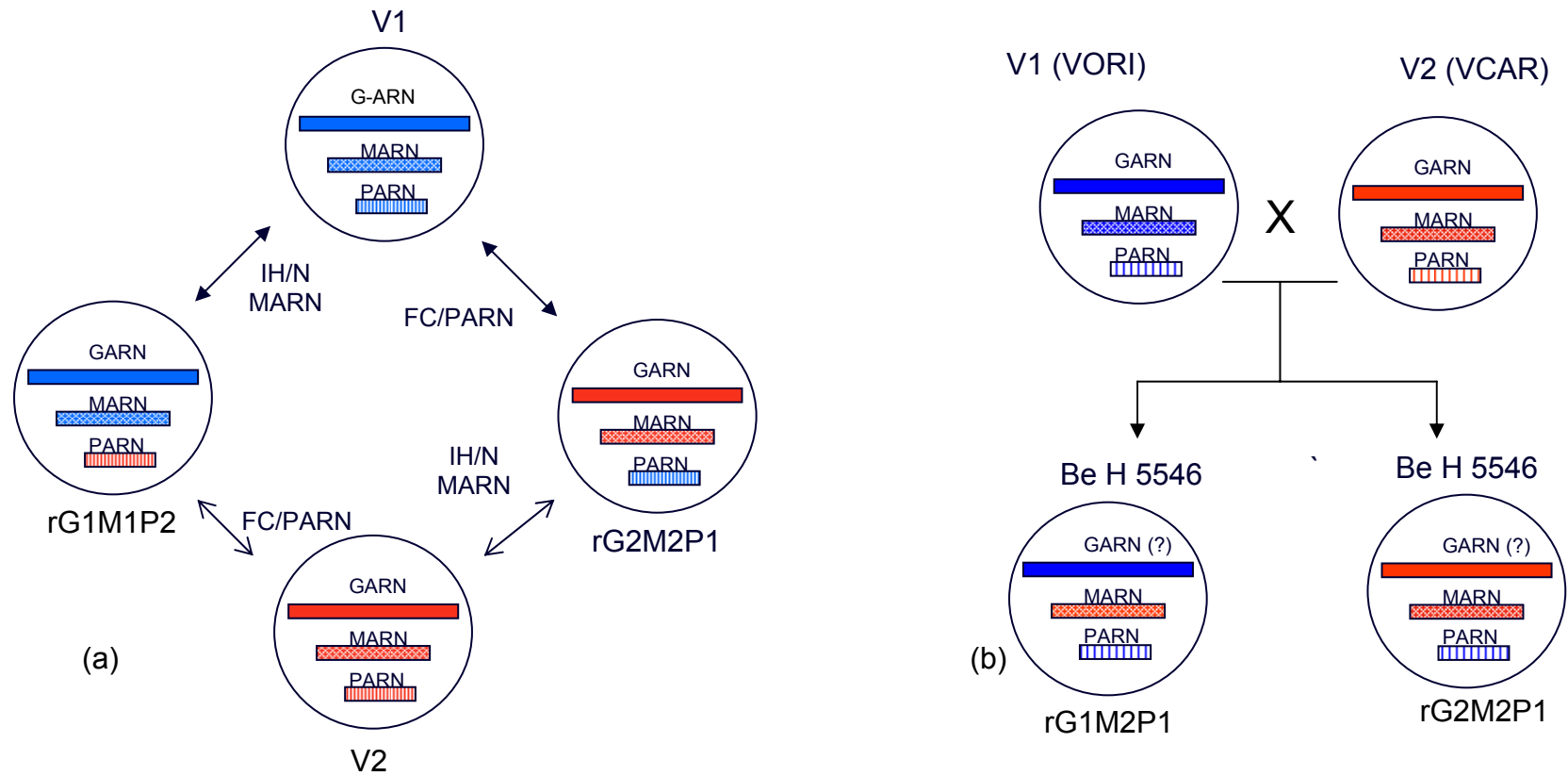


Figura 20 – Possíveis padrões de rearranjo genético: (a) Padrão de rearranjo para os vírus do grupo C comparando o relacionamento antigênico pelos testes de FC, IH e N, ao genético baseado nas seqüências obtidas para os segmentos P-ARN e M-ARN. (b) Padrão de rearranjo para a cepa viral BeH 5546. V1: vírus parental 1; V2: vírus parental 2; rG1M1P2, rG2M2P1 e rG1M2P1: possíveis progênies virais fruto do processo de rearranjo genético entre os vírus do grupo C.

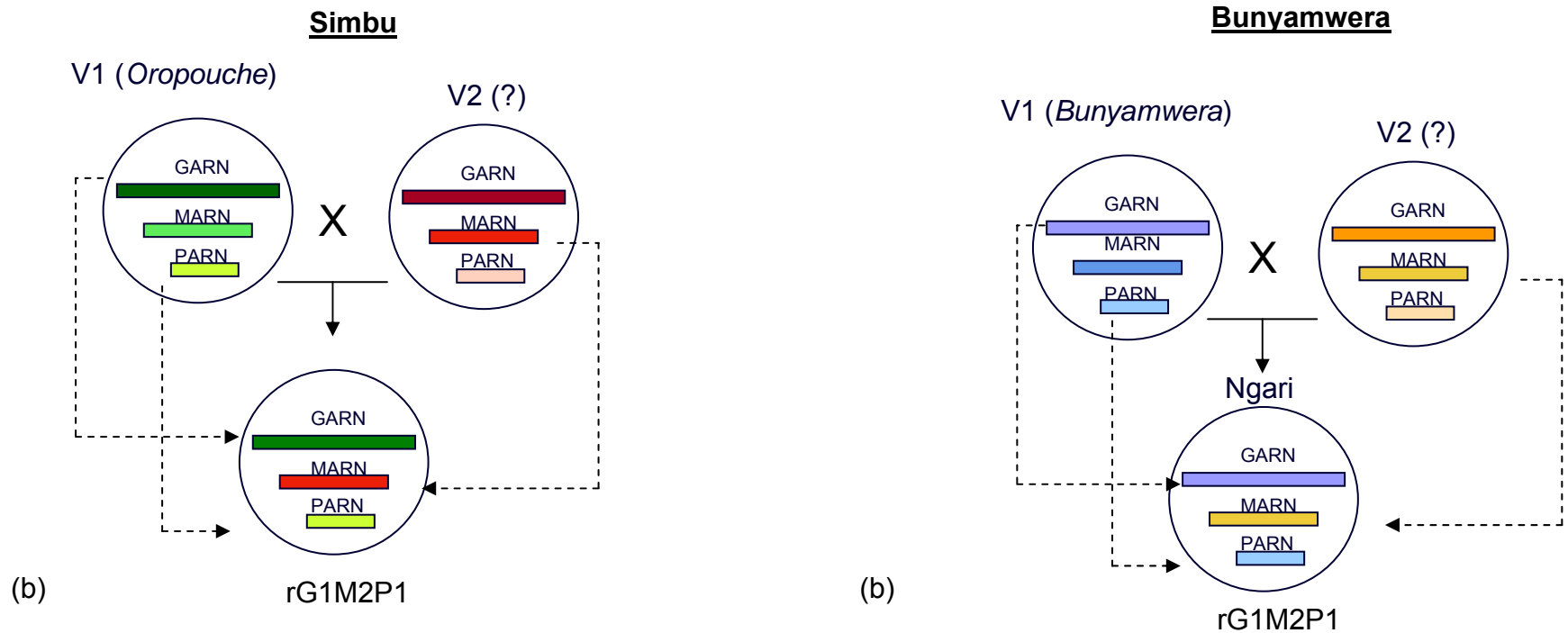


Figura 21 – Possíveis padrões de rearranjo genético para outros ortobunyavírus: (a) Vírus Jatobal (*Orthobunyavirus*, grupo Simbu) e (b) Vírus Ngari (*Orthobunyavirus*, grupo Bunyamwera). Setas pontilhadas indicam a origem dos segmentos de ARN dos vírus Jatobal e Ngari mediante rearranjo genético com vírus não identificados (V2?) e seus correspondentes vírus parentais (V1), *Oropouche* e *Bunyamwera*, respectivamente. rG1M2P1 corresponde a provável progene viral gerada pelo rearranjo genético dos segmentos de ARN.

4. DISCUSSÃO

Ao longo de pelo menos 50 anos de estudos, entre 1954 e 2004, centenas de amostras dos vírus do grupo C foram isoladas na Amazônia brasileira e identificadas segundo o diagrama de Shope & Causey (1962). Todas as amostras foram identificadas pelos testes de FC e IH e/ou N, reagindo dentro do padrão esperado, ou seja, com um dos seis protótipos virais mais comumente encontrados na região Amazônica, os VAPEU, VMTB, VORI, VMUR, VCAR e VITQ, formando os pares clássicos previamente descritos, com exceção de diversas variantes do VCAR, isolados da cepa viral BeH 5546, que apresentaram comportamento antigênico distinto das demais, reagindo por FC com o VORI e por IH com o VCAR, sendo por conseguinte consideradas amostras aberrantes.

Posteriormente, estudos sorológicos e ecológicos desenvolvidos por Shope *et al.* (1988) evidenciaram que a par de um complexo padrão de relacionamento antigênico, esses agentes eram transmitidos dentro de um ecossistema compacto compartilhando vetores e hospedeiros vertebrados para a manutenção do seu ciclo biológico, sugerindo a possibilidade de haver co-infecção de mosquitos e/ou vertebrados com dois vírus do grupo C. Baseado nessas observações, sugeriu-se que os vírus do grupo C constituíam um modelo ideal para o estudo de rearranjo genético em natureza (Shope *et al.*, 1988).

Para melhor entender o relacionamento genético dos vírus do grupo C, os segmentos P-ARN dos 13 vírus protótipos e da amostra BeH 5546 foram completamente sequenciados e as seqüências parciais do segmento M-

ARN ao nível do gene Gn foram obtidas para sete desses vírus e para a amostra BeH 5546 . A análise das seqüências obtidas para os segmentos P e M dos vírus do grupo C, sugeriu diferenças marcantes no posicionamento dos VAPEU, VMTB, VORI, VCAR, VITQ, VMUR, VRES e da amostra viral BeH 5546 nas árvores filogenéticas construídas, e conseqüentemente troca na associação dos pares genéticos. Segundo a análise genética para os segmentos genômicos estudados, a amostra Be H 5546 recebeu o segmento P-ARN do VORI e o segmento M-ARN do VCAR, fato que corrobora e explica o diferente padrão de relacionamento antigênico desta amostra em relação as demais, o que nos leva a sugerir que a mesma corresponde ao resultado de um rearranjo genético em natureza entre os VORI e VCAR. Por outro lado, os VCAR e VBCR apresentaram o segmento P-ARN geneticamente indistinguíveis com homologia entre suas seqüências nucleotídicas de 99,3% (Tabela 7). De acordo com esse resultado, o VBRC atualmente reconhecido como uma subespécie do vírus VCAR, poderia ser ou uma amostra do VCAR, caso o seu segmento M-ARN seja semelhante ao do VCAR, ou um vírus rearranjado entre o VCAR e um outro possível vírus do grupo C ainda não identificado, caso seu segmento M mostre divergência genética significativa em relação ao segmento M do VCAR. A definição, neste contexto, so será possível quando o segmento M-ARN do VBRC for seqüenciado.

A combinação de testes sorológicos, tais como IH, N e FC proporcionaram a atual classificação dos vírus do grupo C em quatro complexos (Caraparu, Oriboca, Marituba e Madrid). Esta classificação foi determinada pelas propriedades conferidas por anticorpos neutralizantes e/ou

inibidores da hemaglutinação, os quais são predominantemente codificados ao longo do segmento M-ARN. A distribuição dos vírus do grupo C em três principais grupos genéticos (I, II e III), baseada na informação do gene N (segmento P-ARN), está de acordo com dados fornecidos pelo teste de FC que detecta anticorpos fixadores de complemento codificados ao longo do segmento P-ARN dos ortobunyavírus, e diferiu significativamente da classificação atual baseada nos resultados de IH e N.

Em termos epidemiológicos, a associação dos achados genéticos aos dados antigênicos e eco-epidemiológicos (distribuição geográfica, ciclo biológico, principais vetores e hospedeiros vertebrados) nos permitiu fazer inferências importantes que nos levaram a uma melhor compreensão a respeito da interação desses fatores na geração da biodiversidade viral desses agentes . Em relação à distribuição geográfica e a genética dos vírus do grupo C, verificou-se que vírus isolados em regiões geograficas relativamente distantes, tais como os VGL (Estados Unidos) e VAPEU (Brasil) , VMTB (Brasil) e VNEP (amostra isolada em Trinidad) compartilharam o grupo genético III. Ao se analisar os grupos I e II, a mesma observação pode ser feita, visto que os mesmos albergaram vírus isolados no Brasil, Panamá e Equador, e vírus isolados em Trinidad e no Brasil, respectivamente. Outro importante exemplo pode ser citado para os VMAD e VOSSA, que embora tenham sido isolados no mesmo ano, em 1961 e de humanos residentes na província de Boca del Toro no Panamá (Karabatsos, 1985; 2002), mostraram uma alta divergência genética estimada em 35,5%, tendo inclusive o VMAD sido posicionado fora dos três grupos, enquanto que o VOSSA foi incluído no grupo I (Figura 18).

A avaliação dos dados genéticos e geográficos sugere um intenso trânsito dos vírus do grupo C pelas Américas, onde diferentes tipos virais isolados em diferentes períodos, tanto de artrópodes quanto de vertebrados, podem ser encontrados em circulação principalmente em regiões tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul. No entanto, as diferenças em termos de dispersão geográfica encontrada para esses vírus, parecem não ter influenciado substancialmente na genética desses agentes virais.

Por outro lado, parece existir alguma correlação entre a associação vírus-hospedeiro. A análise filogenética de amostras isoladas de diferentes hospedeiros, dentre humanos, mosquitos (artrópodes), vertebrados silvestres (roedores, marsupiais) e animais sentinelas (primatas não humanos e camundongos), mostraram que amostras isoladas de humanos são geneticamente mais semelhantes entre si do que com amostras isoladas de outros hospedeiros. Este fato pode ser explicado pela ecologia dos vírus do grupo C que envolvem preferencialmente vertebrados e artrópodes silvestres em seu ciclo natural de manutenção. Neste caso, os humanos, enquanto hospedeiros incidentais, parecem favorecer de forma seletiva o aparecimento de cepas virais diferenciadas, exercendo um papel importante na manutenção da biodiversidade genética desses vírus (Figura 16).

Aplicando o modelo hipotético de rearranjo genético dos vírus do grupo C (Figura 19) e associando este modelo aos dados antigênicos de Shope & Cousey (1962), pode-se sugerir que os vírus do grupo C em geral seguem um padrão de rearranjo único utilizando as progenes virais rG1M1P2 e rG2M2P1. Em relação à amostra viral BeH 5546, duas hipóteses podem ser

levandadas, uma vez que não se conhece a seqüência nucleotídica para os segmentos G-ARN dos VORI e VCAR, considerados como possíveis vírus parentais.

A primeira hipótese, levanta a possibilidade da cepa viral BeH 5546 ser um rearranjo do VORI que recebeu o segmento M-ARN do VCAR, sendo portanto um vírus rearranjado do tipo rG1M2P1. A segunda hipótese, sugere que a amostra viral BeH 5546 seja um rearranjo do VCAR que recebeu o segmento P-ARN do VORI, sendo, neste caso, um vírus rearranjado do tipo rG2M2P1 (Figura 20). Para melhor avaliar qual o mecanismo de rearranjo genético envolvido no surgimento da cepa viral BeH 5546, será necessário seqüenciar parte do segmento G-ARN dos três vírus possivelmente envolvidos: VORI, VCAR e BeH 5546.

Em relação aos outros ortobunyavírus, o modelo hipotético de rearranjo genético idealizado para os vírus do grupo C pode ser aplicado aos vírus Jatobal (grupo Simbu) e Ngari (grupo Bunyamwera), este último associado a casos humanos de febre hemorrágica na África. De acordo com trabalhos anteriores (Saeed *et al.*, 2000; 2001) o vírus Jatobal é um exemplo de rearranjo genético ocorrido em natureza, recebendo os segmentos P-ARN e G-ARN do vírus *Oropouche* e o segmento M-ARN de um vírus ainda não identificado pertencente ao grupo Simbu. De modo similar, o vírus Ngari, também considerado um vírus rearranjado (Guerrard *et al.*, 2004), herdou o segmento P-ARN e G-ARN do vírus *Bunyamwera*, e o segmento M de um vírus do grupo Bunyamwera ainda não identificado. Segundo o modelo hipotético de rearranjo genético dos vírus do grupo C, os vírus Jatobal e Ngari são vírus

rearranjados do tipo rG1M2P1 o que indica que ambos possivelmente utilizaram o mesmo padrão de rearranjo genético (Figura 21).

Comparando o padrão de rearranjo genético observado para os vírus do grupo C aos evidenciados para os vírus Ngari e Jatobal, pode-se verificar que aparentemente não existe um padrão definido de rearranjo para os vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus*, pelo menos em relação aos representantes dos grupos C, Simbu e Bunyamwera. Isto nos leva a sugerir que os ortobunyavírus procuram diferentes caminhos para a manutenção de sua diversidade viral e, conseqüentemente, sua adaptação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

A análise comparativa dos padrões dos rearranjos genéticos estudados, nos leva a sugerir que os vírus do grupo C, ao longo dos tempos podem estar modificando seu padrão de rearranjo gerando linhagens virais que superpõe gradativamente às linhagens ancestrais. Caso esta hipótese esteja correta, a mesma nos permite sugerir que a amostra viral BeH 5546 é possivelmente um vírus que emergiu mais recentemente que os outros membros do grupo C que circulam atualmente nas Américas, sendo esta amostra fruto do rearranjo genético provavelmente entre os VORI e VCAR.

Embora importantes avanços tenham sido feitos no campo genético, permitindo-nos evidenciar a presença de rearranjo genético entre os vírus do grupo C, bem como sugerir um modelo hipotético para o mecanismo de rearranjo desses vírus, capaz de ser aplicado a outros ortobunyavírus, vale ressaltar que a maneira como determinados fatores (ecossistema, associação vírus-hospedeiro, relação antígenica e genética viral) realmente contribuem

para a biodiversidade viral, ainda é uma questão que permanece sem resposta.

Nossos achados representam os primeiros dados genéticos para os vírus do grupo C em termos de suas seqüências nucleotídicas para os segmentos P-ARN e M-ARN. Esperamos que os mesmos possam proporcionar um melhor entendimento sobre o relacionamento genético desses vírus entre si e com outros ortobunyavírus. Os dados obtidos nesta tese, também evidenciaram que a correlação entre as informações ecológicas, antigênicas e genéticas proporciona um melhor entendimento a respeito da epidemiologia molecular dos arbovírus.

5. CONCLUSÕES

a) O segmento P-ARN dos vírus do grupo C apresenta organização genômica compatível com a de outros ortobunyavírus já seqüenciados;

b) As seqüências nucleotídicas parciais obtidas para o gene Gn de alguns vírus do grupo C sugerem que os mesmos possuem organização genômica similar aos demais ortobunyavírus seqüenciados em relação ao segmento M-ARN;

c) Com base nas seqüências nucleotídicas obtidas para os segmentos P-ARNs dos vírus do grupo C, os VBRC e VCAR são muito semelhantes, mostrando 99,3% de homologia para suas seqüências nucleotídicas, sendo o VBRC portanto, ou uma cepa do VCAR ou um vírus rearranjado entre o VCAR e outro membro do grupo C não identificado;

d) A cepa viral BeH 5546, tida como uma variante do VCAR com comportamento diferenciado pelos testes de FC e IH, de acordo com a análise genética dos segmentos P e M, é provavelmente um vírus rearranjado entre os VORI e VCAR mostrando propriedades antigênicas distintas em relação aos mesmos e aos demais vírus do grupo C.

e) De acordo com a análise genética do segmento P-ARN dos vírus do grupo C, não ficou demonstrado correlação entre distribuição geográfica e diversidade genética desses vírus. Por outro lado, existem indícios de que a diversidade viral está associada à relação vírus-hospedeiro;

f) As árvores filogenéticas construídas pelos métodos de MP e NJ para os segmentos P-ARN e M-ARN dos vírus do grupo C, evidenciaram

topologias diferentes, o que sugere um padrão de rearranjo genético entre esses vírus, corroborando resultados prévios fornecidos pelos testes sorológicos de FC, IH e N;

g) Alguns vírus do grupo C provavelmente são vírus rearranjados que trocaram entre si um segmento genômico em particular (P-ARN ou M-ARN);

h) Os vírus do grupo C são ideais para o estudo do processo de rearranjo viral em natureza, servindo de modelo para o estudo deste mecanismo em outros ortobunyavírus;

i) O modelo hipotético de rearranjo viral estabelecido para os vírus do grupo C pode ser aplicado para estudar o padrão de rearranjo genético de outros ortobunyavírus como demonstrado para os vírus Jatobal e Ngari pertencentes a ortobunyavirus de diferentes grupos sorológicos;

j) Excetuando-se a cepa viral BeH5546, cujo padrão de rearranjo genético não foi definido, utilizando o modelo hipotético de rearranjo genético, a maioria dos vírus do grupo C apresentou padrão de rearranjo diferente dos verificados para os vírus Jatobal e Ngari (rG1M2P1) representantes dos grupos Simbu e Bunyamwera, respectivamente, o que é importante para a biodiversidade desses ortobunyavírus;

k) A associação dos dados eco-epidemiológicos, antigênicos e genéticos é essencial para melhor compreensão da epidemiologia molecular dos ortobunyavírus, e deve ser sempre considerada nas análises filogenéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., GISH, W. Local alignment statistics. **Methods on Enzymology**, **266**: 460-480, 1996.
- ARCHER, A. M; RICO-HESSE, R. High specific genetic divergence and recombination in arenaviruses from the Americas. **Virology**, **304**: 274-281, 2002.
- BEATY, B. J.; BORUCKI, M.; FARFAN, J.; WHITE, D. Arbovirus-vector interactions: determinants of arbovirus evolution. In: **Factors in the emergence of arbovirus diseases**. J.F. Saluzzo, & B. Dodet, (eds.). Paris, Elsevier, 1997. p.23-35.
- BISHOP, D.H.L.; CALISHER, C.; CASALS, J. *Bunyaviridae*. **Intervirology**, **14**:125-143, 1980.
- BISHOP, D.H.L.; BEATY, B.J. Molecular and biochemical studies of the evolution, infection and transmission of insect bunyaviruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, **311**: 326-338, 1988.
- BISHOP, D.H.L.. *Bunyaviridae* and their replication. Part I: Structure of *Bunyaviridae*. In: **Virology**. B.N. Fields & D.M., Knipe. (eds). Raven, New York, *Virology*, 2nd, 1990. p.1155-1173.
- BORUCKI, M.K.; CHANDLER, L.J.; PARKER, B.M.; BLAIR, C.D.; BEATY, B.J. Bunyavirus superinfection and segmented reassortment in transovarially infected mosquitoes. **Journal of General Virology**, **80**: 3173-3179, 1999.

- BOULOY, M. *Bunyaviridae*: Genome organization and their replication strategies. **Advances in Virus Research**, **40**: 235-266, 1991.
- 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**: 185-190, 2001.
- BÜCHEN-OSMOND, C. *Bunyaviridae*. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3**. ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, AZ, USA, 2003.
- CALISHER, C.H.; COIMBRA, T.L.; LOPEZ, O.D.E.S.; MUTH, D.J.; SACCHETTA L.D.E.A.; FRANCY, D.B.; LAZUICK, J.S.; CROPP, C.B. Identification of new Guama and Group C serogroup bunyaviruses and an ungrouped virus from Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **32**: 424-31, 1983.
- CALISHER, C.H. Evolutionary, ecological and taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U.S.A and Brasil. In: **An overview of Arbovirology in Brasil and neighbouring countries**. A.P.A. Travassos da Rosa, P.F.C. Vasconcelos & J.F.S Travassos da Rosa (eds.). Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, 1998. p. 32-41.
- CASALS, J.; WHITMAN, L.; Group C, a new serological group of hitherto undescribed arthropod-borne viruses, Immunological studies, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **10**:250-258, 1961.

CAUSEY, O.R., CAUSEY, C.E.; MAROJA, O.M.; MACEDO, D.G. The isolation of arthropod-borne viruses including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** , **10**:227, 1961.

CHARREL, R.N.; FELDMANN, H.; FULHORST, C.F.; KHELIFA, R.; DE CHESSE, R.; DE LAMBALLERIE, X. Phylogeny of new World arenavirus based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **296**: 1118-1124, 2002.

CLERX-VAN HAASTER, C.M.; BISHOP, D.H.L. Analysis of the 3' terminal sequences of Snowshoe Hare and La Crosse bunyaviruses. **Virology**, **105**: 564-574, 1980.

CLERX-VAN HAASTER, C.M.; AKASHI, H.; AUPERIN, D.D.; BISHOP, D.H.L.,. Nucleotide sequence analyses and predicted coding of bunyavirus genome RNA species. **Journal of Virology**, **41**:119-128, 1982a.

CLERX-VAN HAASTER, C.M.; CLERX, J.P.M.; USHIJIMA, H.; AKASHI, H.; FULLER, F.; BISHOP, D.H.L. The 3' terminal sequences of bunyaviruses and nairoviruses (*Bunyaviridae*). Evidence of end sequence generic differences within the virus family. **Journal of General Virology**, **61**: 289, 1982b.

- De PAOLA, D.; BRUNO-LOBO, M.; DUARTE, F. Histopatologia experimental dos arbovírus do grupo C e Guamá. **Anais de Microbiologia, 11 (Parte B):**133-160, 1963.
- DIAS, L.B. Histopatologia das arboviroses amazônicas. In: **Simpósio Internacional sobre arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas.** F.P. Pinheiro (ed.) Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1982. p.171-174.
- DUNN, E.F.; PRITLOVE, D.C.; ELLIOTT, R.M. The SRNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway Bunyaviruses: sequence determination and analysis. **Journal of General Virology, 70:** 597-608, 1994.
- ELLIOTT, R.M. Identification of non-structural proteins encoded by viruses of the Bunyamwera serogroup (family *Bunyaviridae*). **Virology, 143:**119-124, 1985.
- ELLIOTT, R.M. Nucleotide sequence analysis of the SRNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. **Journal of General Virology, 70:**1281-1285, 1989a
- ELLIOTT, R.M. Nucleotide sequence analysis of large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. **Virology, 173:** 426-436, 1989b.
- ELLIOTT, R.M.; MCGREGOR, A. Nucleotide sequence and expression of the small (S) RNA segment of Maguari bunyavirus. **Virology, 171:** 501-522, 1989.

- ELLIOTT, R.M. Molecular biology of the *Bunyaviridae*. **Journal of General Virology**, **71**:501-522, 1990.
- ELLIOTT, R.M.; BOULOY, M.; CALISHER, C.H.; GOLDBACH, R.; MOYER, J. T.; NICHOL, S.T.; PETTERSON, R.; PLYUSNIN, A.; SCHMALJOHN, C. S. Family *Bunyaviridae*. In: **Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, & D.H.L. Bishop (eds.). San Diego, California, Academic Press, 2000, p.599-621.
- FAZAKERLEY, J.; GONZALEZ-SCARANO, F.; STRICKLER, J.B.; KARUSH, F.; NATHANSON, N. Organization of the middle RNA segment of Snowshoe Hare bunyavirus. **Virology**, **167**: 422-433, 1988.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, **39**: 783-791, 1985.
- FENNER, J.F. & WHITE, D.O. *Bunyaviridae*. In: **Medical Virology**. J.F Fenner, & D.O. WHITE (eds.). Ingleterra, Academic press, 1994. p.509-521.
- GENTSCH, J.R.; BISHOP, D.H.L. Recombination and complementation between Snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. **Journal of Virology**, **31**:707-717, 1976a
- GENTSCH, J.R.; BISHOP, D.H.L. Recombination and complementation between temperature-sensitive mutants of a bunyavirus, Snowshoe hare virus. **Journal of Virology**, **20**:351-354, 1976b.
- GENTSCH, J.R.; ROZHON, E.J.; KLIMAS, R.A.; EL SAID, L.H.; SHOPE, R.E.; BISHOP, D.H.L. Evidence from recombinant bunyavirus studies that the M

- RNA gene products elicit neutralizing antibodies. **Virology**, **1**: p.190-204, 1980.
- GERRARD, S.R.; LI, L.; BARRETT, A.D.; NICHOL, S.T. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. **Journal of Virology**, **16**: 8922-6, 2004
- GOLDMAN, N., ANDERSON, J.P., RODRIGO, A.G., Likelihood-Based test of Topologies in Phylogenetics. **Systematic Biology**, **49(4)**: 652-670, 2000.
- GONZALES-SCARANO, F.; BEATY, B.; SUNDIN, D.; JANSSEN, R.; ENDRES, M.J.; NATHANSON, N. Genetic determinants of the virulence and infectivity of La Crosse virus. **Microbial Pathogenesis**, **4**:1-7,1989.
- HERVÉ, J.P., DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P., SÁ FILHO, G.C. Aspectos ecológicos das arboviroses. In: **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e a Medicina Tropical**. Belém, Pará, Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p. 405-437.
- HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J.; FUSHS, R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. **Computer Applications in the Biosciences**. **8**:189-91, 1992.
- HOLLAND, J.; DOMINGO, E. Origin and evolution of viruses. **Virus Genes**, **16**: 13-21, 1998.
- HYDE, M. O; HYDE, L. E. **Cloning and the New Genetics**. Hillsdale, NJ, Enslow, Inc., 1984.
- IVERSSON, L.B.; TRAVASSOS DA ROSA, AP.A; COIMBRA, T.L.M.; FERREIRA, I.B.; NASSAR, E.S. Human disease in Ribeira Valley, Brazil

- by Caraparu, a group C arbovirus – report of a case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **29**: 112-117, 1987.
- JONKERS, A.H.; SPENCE, L.; KARBAAT, J. Arbovirus infection in Dutch military personnel stationed in Surinam. Further studies, **Tropical Geographical Medicine**, **20**:251, 1968a.
- JONKERS, A.H., SPENCE, L., DOWNS, W.G., AITKEN, T.H.G.; WORTH, C.R. Arbovirus studies in Bush Bush Forest, Trinidad, W. I. VI. Rodent associated viruses (VEE and agents of group C and Guama). Isolations and further studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **17**: 285-298, 1968b
- KARABASTOS, N. **International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates**. 3rd ed. San Antonio, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, p.33, 1985.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates**. The American Committee on Arthropod-Borne Viruses. 2000 Annual Report on the Catalogue of Arthropod-Borne and Selected Vertebrate Viruses of the World, Subcommittee on Information Exchange, nº 108, 2002.
- KITAJIMA, E.W.; GOLGHER, R.R.; FERREIRA, P.C.P.; LANA, M.C.; PEREZ, J.N. Microscopia eletrônica dos arbovírus do grupo C e do agente “Cotia-like”. In: **Simpósio Internacional Sobre Arbovírus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas**. F.P. Pinheiro (ed.). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1982. p.193 -203.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of General Virology** , **77**: 1761-1768, 1980.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Version 1.01**. The Pennsylvania State University, 2000.
- 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**: 1-14,1986.
- METSELAAR, D. Isolation of arboviruses of group A and C in Surinam. **Tropical Geographical Medicine**, **18**:137-142, 1966.
- MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; WITHFIELD, S.G. *Bunyaviridae*: morphologic and morphogenetic similarities of *Bunyamwera* serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. **Intervirology**, **1**:297, 1973.
- MURPHY, F.A. Virus Taxonomy. In: **Virology**. B.N. Fields, B.N., D.M. Knipe & , P.M. Honleyl (eds.) Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 15-57.
- 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**. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley & D. E. Griffin (eds.), , Philadelphia, Pa, Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1603 – 1633.

- PINHEIRO, F.P. Arboviral Zoonoses in South America. In: **CRC Handbook series in Zoonoses, section B: Viral Zoonoses**. J. H. Steele & G. W. Beron (eds.), Boca Raton, FL, CRC Press, 1981. p.159-163.
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FREITAS, R.B.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém, Pará, Fundação SESP, 1986. p. 375-408.
- PINHEIRO, FP.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Arboviral zoonoses of Central and South America. In: **Handbook of Zoonoses**. G. Beran. (ed.). Boca Raton, New York, CRC press, 1994. p. 214-217.
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. R. Veronesi & R. Foccacia (eds.). São Paulo, Editora Ateneu, 1996. p. 169-180.
- PRINGLE, C.R. Genetics and genome segment reassortment. In: **The Bunyaviridae**. R. M. Elliott (ed.). New York, NY, Plenum Press, 1996. p. 189-226.
- RAJU, R.; KOLAKOFSKY, D. The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within the nucleocapsid are based paired. **Journal of Virology**, **63**: 122-128,1989.
- RIFKIN, J. **The Biotech Century**, New York, Pengium, Putnam, 1998.
- SAEED, M.F.; WANG, H.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; WEAVER, S.C.; SHOPE, R.E.; WATTS, D.M.; TESH, R.B.; BARRETT,

- A.D.T. 2000. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **Journal of General Virology**. **81**: 743-748.
- SAEED, M.F.; WANG, H.; SUDERMAN, M.; BEASLEY, D.W.; TRAVASSOS DA ROSA. A.; LI, L.; SHOPE, R.E.; TESH, R.B.; BARRETT, A.D. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. **Virus Research**, **77**: 25-30, 2001
- SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: **PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification**. A. Henry (ed.), 1990. p. 7-16.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, **4**: 406-425, 1987.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, **74**: 5463-5467, 1977.
- SCHMALJOHN, C.S.; PATTERSON, J.L. Bunyaviridae and their replication. Part II. Replication of Bunyaviridae. In: **Virology**. B.N. Fields & D.M. Knipe (eds.) New York, NY, Raven press, 1990. p 1175-1194.
- SCHMALJOHN, C.S.; PATTERSON, J.L. Bunyaviridae and their replication. In: **Fundamental Virology, 2nd ed**. B.N. Fields & D.M. Knipe (eds.) New York, NY, Raven press, 1991. p. 545-566.
- SCHMALJHON, C.S; HOOPER, J.W. *Bunyaviridae*: the viruses and their replication. In: **Virology**. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, and D.G.

Griffin (eds.) Lippincot Willians & Wilkins, Philadelphia, Pa, 2001.p1581-1602.

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.; WHITMAN, L. Nepuyo virus, a new group C agent isolated in Trinidad and Brazil. II Serological studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **15**: 772, 1966.

SHOPE, R.E; SATHER, G.E. Arboviruses. In: **Diagnostic Procedures for Viral, Ricktsial and Chlamydial Infections, 5th Edition**. E. H. Lennette & N.J. Schmidt (eds.). Washington, American of Public Health Association, 1974. p.767-814.

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**. T.P. Monath (ed.). Boca Raton, USA, CRC press, 1988. p. 37-52.

SPENCE, L.; ANDERSON, C.R.; AITKEN,T.H; DOWNS, W.G. Nepuyo virus, a new group C agent isolated in Trinidad and Brazil. I. Isolation and properties of the Trinidadian strain. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **15**: 71-74, 1966.

SPENCE, L.; JONKERS, A.H.; GRANT, L.S. Arboviruses in the Caribbean Islands **Progress in Medical Virology**, **10**: 415-86, 1968.

- SWOFFORD, D. L. **PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods, version 4.** Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1999.
- TODA, A.; SHOPE, R.E. Transmission of Guama and Oriboca viruses by naturally infected mosquitoes. **Nature**, **208**: 304, 1965.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S; PINHEIRO, F.P.; VASCONCELOS, P.F.C. Arboviruses. **In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico.** R.N.Q. Leão (ed.). Belém, editora CEJUP, 1997. p. 208-225.
- VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.; RODRIGUES, S.G.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. **In: An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries.** A.P.A. Travassos da Rosa, J.F.S. Travassos da Rosa & P.F.C. Vaconcelos (eds.), Belém, Instituto Evandro Chagas, 1998. p.72-99.
- WOODALL, J.P. Virus Research in Amazônia. Atas do Simpósio Sobre a Biota Amazônica. **6 (Patologia):**31-63, 1967
- WOODS, C.W.; KARPATI, A. M.; GREIN, T.; McCARTHY, N.; GATURUKU, P.; MARTIN, E.L.; MANN, P.; SMOAK, B.L.; RYAN, M.; KSIAZEK, T.G.; ARTHUR, R.R.; NDIKUYEZE, A.; AGATA, N.N.; PETERS, C.J. An outbreak of Rift Valley fever in northern Kenya, 1997-98. **Emerging of Infectious Diseases**, **8**: 138-144, 2002

APÊNDICE

COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES E SOLUÇÕES

1. IPTG (Isopropil-bDtiogalactopiranoside): solução estoque (0,1M).

Ao frasco de IPTG (Promega) contendo 1,2g do reagente, adicionar água bidestilada para o volume final de 50 mL. Filtrar, esterelizar e armazenar a 4°C.

2. X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-idolil- β -D- galactoside).

Dissolver 100 mg de X-Gal (Promega) em 2 mL de N,N'-dimetil formamida (invitrogen). Proteger o frasco da luz e armazenar a -20°C.

3. Meio LB.

Para cada 1000 mL de água bidestilada adicionar:

- 10g de triptona (Bacto ® triptona, Promega)
- 5g de extrato de fungo (Bacto ® extrato de fungo, Promega)
- 5g de NaCl

Ajustar o pH para 7,0 adicionando cuidadosamente solução de NaOH a 0,1 M.

4. Placas contendo meio LB, ampicilina, IPTG e X-Gal.

Adicionar 15g de agar a 1000 mL de meio LB e autoclavar a solução a 120°C por 30 minutos. Resfriar o meio a 50°C e adicionar ampicilina, IPTG e X-Gal para as concentrações finais de 100 μ g/mL, 0,5 mM e 80 μ g/mL,

respectivamente. Adicionar entre 30-35 mL de meio no interior de placas de petri de 85 mm e deixá-las a T.A até a completa solidificação do meio.

5. Meio SOC

Para cada 100 mL de água bidestilada adicionar:

- 2g de Bacto ® triptona (Promega)
- 0,5g de Bacto ® extrato de fungo (Promega)
- 1 mL de NaCl 1M
- 0,25 mL de KCl 1M
- 1mL de solução estoque de Mg^{2+} 2M
- 1mL de glicose 2M

Inicialmente adicionar a triptona (Bacto ® triptona), o extrato de fungo (Bacto ® extrato de fungo) NaCl e KCl para o volume de 97 mL. Em seguida, promover a completa dissolução dos componentes da solução, autoclavar e resfriar a mesma à T.A. Posteriormente, adicionar as soluções estoques de íon magnésio (Mg^{2+} 2M) e glicose 2M, cada uma para a concentração final de 20mM. Completar o volume da solução para 100 mL ajustando o pH para 7,0

5.1 Solução estoque Mg^{2+} 2M.

- 20,33g de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$
- 24,65g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- 100 mL de água bidestilada

5.2 NaCl 1M

- 5,84 g de NaCl
- 100 mL de água bidestilada

5.3 KCl 1M

- 7,46g de KCl
- 100 mL de água bidestilada

5.4 Glicose 2M

- 36g de glicose
- 100 mL de água bidestilada